Zur Struktur der 250 Å-Faser des Interphasechromatins

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt

von

PETER NEHLS

aus Heidenheim /Brz

1977

529

Zur Struktur der 250 Å-Faser des Interphasechromatins

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt

von

PETER NEHLS

aus Heidenheim/Brz

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 25. August 1977

Dekan: Professor Dr. D. Ammermann

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. C. Pelling

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Seyffert

Gesamtherstellung: **aku**-Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. ERGEBNISSE	8
1. Löslichkeit von Chromatin	8
1.1. Verhalten von nichtfragmentiertem Chromatin	8
1.2. Isolierung von Chromatin nach DNS-Abbau mit Nuklease in situ	9
2. Struktur und Eigenschaften von löslichem Chromatin	14
2.1. Elektronenmikroskopische Strukturuntersuchung von Chromatinfasern	14
2.1.1. Faserstruktur in Lösungen niedriger NaCl-Konzentration (10 mM)	16
2.1.2. Faserstruktur in Lösungen mittlerer NaCl-Konzentrationen (70 mM)	21
2.1.3. Die 200 Å-Faser	25
2.2. Sedimentations- und Histon-Analysen	27
2.2.1. Sedimentationsverhalten von Chromatinfragmenten in Lösungen mittlerer (80 mM) und niederer (5 mM) NaCl-Konzentrationen	27
2.2.2. Histonanalysen von verschieden großen Chromatinfragmenten in Lösungen mittlerer (80 mM) und niederer (5 mM) NaCl-Konzentration	30
2.2.3. Entfaltung der 200 Å-Faser zur 85 Å-Faser	34
2.3. Kooperative Bindung von H1 an Nukleosomenketten	38
2.3.1. Löslichkeit und H1-Gehalt von Chromatinfragmenten nach längerer Abbauzeit mit Nuklease	38
2.3.2. Kompetition großer und kleiner H1-freier Fragmente um H1 im Filterbindungstest	41
2.4. H1-freies Chromatin	43
2.4.1. Sedimentationsverhalten von H1-freien Chromatinfragmenten vor und nach Rekombination mit H1	44
2.4.2. Struktur von Chromatinfasern vor und nach Rekombination mit H1	45
III. DISKUSSION	49

Seite

IV. MATERIAL UND METHODEN 61

1. Präparation von Zellkernen aus Kalbslymphozyten 61
2. Präparation von Chromatin nach DNS-Abbau mit Nuklease in situ 62
3. Abbau großer Chromatinfragmente zu kurzen Nukleosomenketten 63
4. Präparation von ^{3}H-Thymidin-markiertem Lymphozytenchromatin 63
5. Histon H1-Abtrennung von Chromatin 64
6. Isolierung von Histon H1 65
7. Rekombination von H1-freiem Chromatin mit H1 65
8. Sedimentationsanalysen der Chromatinfragmente 66
9. Filterbindungstest 66
10. Elektronenmikroskopie 67
    - 10.1. Kohlebefilmte Trägernetze 67
    - 10.2. Präparation hydrophiler Kohleoberflächen 69
        - 10.2.1. Albumin-Beschichtung von kohlebefilmten Trägernetzchen 69
        - 10.2.2. Glimmentladung 70
    - 10.3. Präparationstechniken 70
        - 10.3.1. Aufbringen des Materials auf die Objektträger 70
            - 10.3.1.1. Aus Suspensionen oder Lösungen 70
            - 10.3.1.2. Spreitung von Kernen 71
        - 10.3.2. Trocknung und Kontrastierung 71
            - 10.3.2.1. Negativ-Färbung mit Uranyl-Acetat 71
            - 10.3.2.2. Ficoll-Technik 71
    - 10.4. Allgemeines 72
11. Fixierung von Chromatin 72
12. Elektrophoretische Analysen 73
    - 12.1. DNS-Agarose-Gel-Elektrophorese 73
    - 12.2. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese 74

V. ZUSAMMENFASSUNG 76

VI. LITERATUR 77

EINLEITUNG

Im Chromatin der Eukaryonten ist die Desoxyribonukleinsäure (DNS) mit Histonen, Nichthistonproteinen (NHP) und geringen Mengen an Ribonukleinsäuren (RNS) assoziiert. Das Massenverhältnis der DNS zu den Histonen ist in allen Geweben und Spezies ungefähr konstant und liegt bei etwa 1, während der Gehalt an NHP in verschiedenen Geweben derselben Spezies unterschiedlich groß zu sein (DNS/NHP = 1/0.2 - 1) scheint. Im Gegensatz zu NHP und RNS spielen die Histone für die Strukturierung des Chromatins eine entscheidende Rolle.

Chromatin kann im Elektronenmikroskop (EM) in Form definierbarer Fasertypen dargestellt werden. An verschiedenen Pflanzen- und Tiergeweben konnte mit der Spreittechnik nach GALL (1963) gezeigt werden, daß Chromosomen aus Interphasekernen (GALL, 1963, 1966; RIS, 1963, 1966, 1967; Du PRAW, 1965, 1970; WOLFE, 1965; STUBBLEFIELD, 1973), sowie mitotische und meiotische Chromosomen (Du PRAW, 1965; WOLFE, 1965; WOLFE und HEWITT, 1966; GALL, 1966; WOLFE und GRIM, 1967) aus flexiblen Fasern mit einem Durchmesser von etwa 250 Å bestehen. Im Gegensatz dazu wurden in Dünnschnitten von Zellkernen und ganzen Zellen Fasern nachgewiesen, die im Mittel nur 100 Å dick waren (siehe Übersichtsartikel von KAUFMANN, 1960; RIS, 1961, 1966; KAYE und McMASTER-KAYE, 1966).

RIS (1966, 1967) erkannte als erster, daß zur Darstellung der 250 Å-Faser zweiwertige Kationen (z.B. Ca^{2+} oder Mg^{2+}) benötigt werden. Wurden Chromosomen auf chelatierenden Agentien (EDTA, Phosphat, Citrat usw.) gespreitet, waren die Fasern nur noch etwa 100 Å dick. Wurden Zellen oder Zellkerne in Lösungen fixiert, die keine Metallionen binden, waren die Fasern in den Dünnschnitten 250 Å dick (DAVIES

und SMALL, 1968; LAMPERT, 1971; DAVIES et al., 1974; RIS, 1975; ZENTGRAF et al., 1975; DAVIES und HAYNES, 1975).

Mit dem Befund von RIS wurde die Diskussion darüber gegenstandslos, ob eine der beiden Fasertypen ein durch die EM-Methode bedingter Artefakt der jeweils anderen sei. Nach Du PRAW (1965b), GALL (1966) und RIS (1969) repräsentiert die 250 Å-Faser die Struktur des inaktiven Chromatins in vivo. Die dicke 250 Å-Faser entsteht nach Ansicht der Autoren durch Abfaltung oder Spiralisierung ("Supercoil") der dünnen 100 Å-Faser. Das Verhältnis von DNS-Länge zu Faserlänge ist bei der 250 Å-Faser nach GOLOMB und BAHR (1974) 28.3 : 1, bei der 100 Å-Faser nach KORNBERG (1974) 7 : 1.

Je nach Spezies und Gewebe sind 80 bis nahezu 100 % der DNS (RIS, 1967; HAMKALO, MILLER, BAKKEN, 1973) in der kondensierten 250 Å-Faserkonformation organisiert. Es gibt keinen Nachweis, daß die DNS in der kondensierten Faser transkribiert wird (HAMKALO et al., 1973). Entsprechende Chromosomenabschnitte bezeichnet man auch als inaktives Chromatin. In den sichtbar transkriptionsaktiven Chromosomenregionen ist die DNS nach HAMKALO et al. weniger stark abgepackt als in der 250 Å-Faser. Ob die genaktiven Regionen in der 100 Å-Faserkonformation vorliegen können oder noch weiter entfaltet sind, wie von WEINTRAUB, WORCEL und ALBERTS (1976) vorgeschlagen wurde, muß erst noch geklärt werden.

In den Jahren 1973 bis 1975 hat eine Reihe von Arbeitsgruppen dazu beigetragen, die Struktur der 100 Å-Faser aufzuklären. Sie läßt sich alleine aus DNS und Histonen aufbauen. Nichthistonproteine - eine heterogene Proteinpopulation von mehr als 200 verschiedenen Molekülen (Le STOURGEON, 1975), zu denen z.B. auch DNS- und RNS-Polymerasen gezählt werden - und RNS werden für die Grundstruktur des

Chromatins nicht benötigt.

Bevor die Struktur der 100 Å-Faser diskutiert wird, sollen die wichtigsten Eigenschaften der Eukaryonten-DNS und der Histone kurz umrissen werden. Im Unterschied zu den Prokaryonten gibt es im Genom der Eukaryonten DNS-Sequenzen, die unterschiedlich häufig vorkommen (DAVIDSON und BRITTEN, 1973). Nach der Häufigkeit ihres Auftretens im Genom werden die DNS-Sequenzen in 3 Klassen eingeteilt: nicht-repetitiv, mittelrepetitiv und hochrepetitiv. Die ersteren sind nur einmal im Genom vorhanden; zu ihnen gehören die meisten Strukturgene. Mittelrepetitive Sequenzen sind durch die Häufigkeit von 10^1 - 10^5 Kopien pro Genom definiert. Zu ihnen werden die Gene für die ribosomale und "transfer" RNS und für die Histone gezählt; Funktion und Bedeutung der meisten dieser Sequenzen sind jedoch nicht geklärt. Die Satelliten-DNS (5 - 300 Bp pro Sequenz) ist mit mehr als 10^5 Kopien pro Genom am häufigsten repetiert. Im Chromosom sind derartige Sequenzen in der heterochromatischen Region der Zentromere lokalisiert. Aus weiteren Studien über die Sequenzorganisation der DNS ist bekannt, daß die nichtrepetierten Sequenzen, die im Mittel 1500 Bp lang sind, jeweils alternierend mit den repetitiven Sequenzen von etwa 300 Bp Länge über das Genom verteilt sind (CHAMBERLIN et al., 1975; DAVIDSON et al., 1977).

Die Histone werden aufgrund ihrer Aminosäurezusetzung und elektrophoretischen Mobilität in fünf Klassen unterteilt:
H1, H2A, H2B, H3 und H4 (JOHNS, 1971; BRADBURY, 1975). Die mittel-lysinreichen Histone H2A und H2B und die argininreichen Histone H3 und H4 haben Aminosäuresequenzen, die von Spezies zu Spezies nur wenig variieren (DeLANGE und SMITH, 1975; SAUTIERE et al., 1975). Eine weitere gemeinsame Eigenschaft dieser vier Histonarten ist die starke Basizität des N-terminalen Segments. Der zugleich hohe Anteil

an Prolin, Serin und Glyzin bewirkt, daß der basische Teil der Histonmoleküle gestreckt vorliegt. Die zentralen und C-terminalen Regionen der Proteine bestehen weitgehend aus apolaren Aminosäuren, die eine helikale Struktur begünstigen. Nach BRADBURY (1975) sind die basischen Enden der Histone H2A, H2B, H3 und H4 an die DNS gebunden, während die helikalen Regionen der Histone miteinander interagieren können.

Das lysinreiche Histon H1 unterscheidet sich in seinen Eigenschaften erheblich von den anderen Histonen. Es ist etwa doppelt so groß (MG ∿ 23.000) wie die übrigen vier Histone (MG = 10.000 - 13.000) und besitzt eine ausgeprägte Art- und Gewebspezifität (RALL und COLE, 1971). Annähernd 25 % des Moleküls bestehen aus basischen Aminosäuren (vornehmlich Lysin). Die meisten Lysinreste und ein hoher Anteil an Prolin wurden in der C-terminalen Molekülhälfte nachgewiesen. Eine weitere basische Region befindet sich im N-terminalen Segment. Etwa in der Mitte des Moleküls ist ein kleiner Teil des Histons aus einer Sequenz von Aminosäuren aufgebaut, die eine helikale Konformation einnehmen kann. Von den fünf Histonen läßt sich H1 am leichtesten aus dem Chromatin extrahieren. Es ist - trotz seiner hohen positiven Ladung - bereits in Salzkonzentrationen von 0.5 - 0.6 M NaCl vollständig vom Chromatin abdissoziiert, während man, um die übrigen Histone vom Chromatin gänzlich abzulösen, die Konzentration bis auf 2 M NaCl erhöhen muß (OHLENBUSCH et al., 1962). Aus Fixierungsexperimenten mit Imidoestern (THOMAS und KORNBERG, 1975; BONNER und POLLARD, 1975) und Aldehyden (Van LENTE et al., 1975) geht hervor, daß H1 nur geringe oder keine Neigungen zur Komplexbildung mit anderen Histonen hat, daß es aber leicht mit sich selbst Oligomere bildet.

Über die Struktur der 100 Å-Faser gibt es folgende Informationen. WOODCOCK (1973) und OLINS und OLINS (1974) benutzten zur elektronenoptischen Darstellung der Chromatinfasern eine Technik, die im Labor von O. MILLER (1969, 1970) entwickelt worden ist: Zellkerne wurden in Wasser lysiert und das ausströmende Chromatin durch 0.1 M Sucrose auf Trägernetze zentrifugiert. Im Elektronenmikroskop konnten anschließend Chromatinfasern sichtbar gemacht werden, die aus sphärischen Partikeln (Nukleosomen, υ-bodies, beads) mit einem Durchmesser von 80 - 100 Å zusammengesetzt werden. Zwischen den Partikeln waren dünne, etwa 15 Å lange Filamente zu sehen.

Der molekulare Aufbau der 100 Å-Faser, welcher der Struktur einer Perlenkette ähnelt, wurde durch Abbauversuche des Chromatins mit DNase I und II und Mikrokokkus Nuklease (CLARK und FELSENFELD, 1971; HEWISH und BURGOYNE, 1973; NOLL, 1974; FINCH et al., 1975; SOLLNER-WEBB und FELSENFELD, 1975; AXEL, 1975; SHAW et al., 1976) mit Fixierungsstudien am Chromatin und an den Histonen (KORNBERG und THOMAS, 1974; THOMAS und KORNBERG, 1975), sowie mit Neutronen-Beugungs-Untersuchungen (BALDWIN et al., 1975) und weiteren elektronenmikroskopischen Techniken (OUDET et al., 1975; GRIFFITH, 1975) weitgehend geklärt: Komplexe aus jeweils acht Histonen (je zwei der Histone H2A, H2B, H3, H4) bilden mit jeweils ungefähr 200 Basenpaaren (Bp) der DNS eine globuläre, sich wiederholende Struktur (Nukleosomen); von den etwa 200 Bp sind 140 Bp um den Histonkomplex gewunden, und etwa 60 Bp verknüpfen die Nukleosomen untereinander (internukleosomale DNS). Histon H1-Molekül sind am Aufbau der Nukleosomen nicht beteiligt (OUDET et al., 1975). Nach VARSHAWSKY et al. (1976) sind die H1-Histone an die internukleosomalen DNS-Abschnitte gebunden.

In vitro sind die Chromatinfasern nur in Wasser oder in Puffern sehr niedriger Ionenstärke löslich. Wird die Ionenstärke erhöht (z.

B. > 20 mM NaCl) präzipitiert das Chromatin. Die Präzipitation der Fasern ist ausschließlich auf den Einfluß von Histon H1 zurückzuführen. Wird z.B. die NaCl-Konzentration in Chromatinlösungen auf etwa 0.5 - 0.6 M erhöht, dissoziiert H1 vom Chromatin ab (OHLENBUSCH, 1962), und die präzipitierten Fasern werden wieder löslich. H1-freie Chromatinfasern bleiben auch über 20 mM NaCl löslich (BRADBURY, 1975; LEWIS et al., 1976).

Die Bindung von H1 an DNS in Lösungen unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen wurde von RENZ und DAY (1976) ausführlich untersucht. Aus ihren Ergebnissen geht hervor, daß in einem Gemisch aus DNS und H1 in Lösungen niedriger NaCl-Konzentrationen (< 20 mM NaCl) die H1-Moleküle gleichmäßig auf alle DNS-Fragmente verteilt sind. Diese Art der Bindung der H1-Moleküle an DNS wird als nichtkooperativ bezeichnet. In Lösungen mittlerer NaCl-Konzentrationen (> 20 mM NaCl) bindet H1 an DNS kooperativ (TOUVET-POLIAKOV et al., 1970; ADLER und FASMAN, 1971; RENZ und DAY, 1976). Dies bedeutet, daß bei einem Überschuß an DNS Histon H1 nur mit einem Teil der DNS-Moleküle stabile Komplexe bildet, während der andere Teil der DNS-Moleküle nicht mit H1 beladen wird.

In einer Population verschieden großer DNS-Fragmente binden die H1-Moleküle bevorzugt an große Fragmente. Der genaue Mechanismus dieser kooperativen Bindung von H1 an DNS ist nicht bekannt; eine mögliche Erklärung für eine bevorzugte Interaktion zwischen H1 und großen DNS-Fragmenten bestünde in der folgenden Vorstellung:

> Ein H1-Molekül hat eine besonders große Affinität zu einem DNS-Fragment, wenn es dort zwischen anderen H1-Molekülen, mit denen es interagieren kann, gebunden ist; es hat eine schwächere Affinität zu den Enden eines DNS-Moleküls, weil es hier nur ein H1-Molekül zum Nachbarn hat. Wenn diese Annahme richtig ist, läßt es sich leicht verstehen, daß H1 bevorzugt an große DNS bindet, denn mit der Größe des DNS-Moleküls wächst die Anzahl der starken Bindungsstellen für H1 im Vergleich zu den schwachen Bindungsstellen an den Enden des DNS-Moleküls.
>
> Die Neigung von H1 präferentiell an große DNS-Fragmente zu binden ließe sich allerdings auch mit Hilfe der bevorzugten Bindung von H1 an AT-reiche Regionen der DNS erklären. Um eine

definitive Aussage über den Mechanismus machen zu können, der zu der beobachteten Bindungspräferenz des H1 führt, bedarf es weiterer Informationen über die Interaktion zwischen DNS und H1.

RENZ und DAY stellten fest, daß der Übergang der nichtkooperativen zur kooperativen Bindung des H1 an DNS in einem engen Salzbereich zwischen 20 und 40 mM NaCl stattfindet. In diesem Salzbereich nimmt der Sedimentationskoeffizient der DNS-H1-Komplexe drastisch zu. Elektronenmikroskopische Studien zeigten (NEHLS, unveröffentlicht), daß das veränderte Sedimentationsverhalten auf eine Abfaltung der DNS-H1-Komplexe zurückzuführen ist und nicht auf deren Aggregation. In NaCl-Lösungen unter 20 mM NaCl liegen die Komplexe gestreckt vor und verhalten sich wie nackte DNS.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluß des Histons H1 auf den Aufbau der Chromatinfaser zu untersuchen. Es interessierten uns die Konformationsänderungen des Chromatins im Salzbereich zwischen 0 und 100 mM NaCl. Dazu mußte zunächst eine Methode gefunden werden, mit der es möglich ist, hohe Ausbeuten an Chromatin aus Interphasekernen zu erhalten, das nicht nur bei Salzkonzentrationen zwischen 0 und 20 mM NaCl sondern auch bei solchen zwischen 20 und 100 mM NaCl löslich ist. Die Morphologie der Fasern wurde zunächst mit elektronenmikroskopischen Methoden untersucht. Sie wurden mit den bekannten Fasern vom 100 Å- und 250 Å-Typ[+] verglichen. Außerdem wurde der Aufbau der Fasern mit biochemischen und physikalisch-chemischen Methoden analysiert.

Es wird gezeigt, daß die 250 Å-Fasern aus globulären Strukturen bestehen. Diese entstehen durch Abfaltung von Chromatinabschnitten mit einer Kettenlänge von jeweils 6 - 10 Nukleosomen. Entscheidend für das Auftreten dieser Struktur ist die Anwesenheit von H1.

[+] Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die Chromatinfasern vom 100 Å- und 250 Å-Typ aufgrund der hier bestimmten mittleren Durchmesser als 200 und 85 Å-Faser bezeichnet.

ERGEBNISSE

1. Löslichkeit von Chromatin

1.1. Verhalten von nichtfragmentiertem Chromatin

Während Interphasechromatin aus Lymphozytenkernen leicht isolierbar ist, indem die Kerne in bidest. Wasser oder 0.2 mM EDTA lysiert werden, bereitete die Isolierung von Chromatin in Lösungen mittlerer Salzkonzentrationen (20 - 100 mM NaCl) bislang insofern Schwierigkeiten, als das Kernmaterial unter diesen Bedingungen aggregiert und ausfällt. Eine wichtige Voraussetzung für die experimentelle Handhabung des Chromatins war es daher Bedingungen zu finden, unter denen das Chromatin trotz höherer Salzkonzentrationen in Lösung gehalten werden kann.

Während des Ablaufs des Präzipitationsvorganges des Interphasechromatins können Zwischenzustände beobachtet werden, bei denen das Chromatin löslich ist.

> Lymphozytenkerne wurden in einer Konzentration entsprechend 1 mg DNA (A_{260} = 20 o.d.) pro ml in 1 mM $CaCl_2$, 70 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.2 suspendiert. Anschließend wurde die Ca^{2+}-Konzentration durch Zugabe desselben Volumens 70 mM NaCl, 10 mM Tris 7.2 auf 0.5 mM herabgesetzt.

So bewirkt das Ausverdünnen der divalenten Ionenkonzentration, daß die Kerne nicht spontan platzen, sondern langsam desintegrieren; dabei klärt die ursprünglich trübe Suspension auf, und es bildet sich vorübergehend eine opaleszierende, dickflüssige Lösung. Nach 20 - 30 sec entstehen Präzipitationskeime, um die - vergleichbar mit Kristallisationsvorgängen - das übrige Chromatin aggregiert und ausfällt.

Versuche, den Präzipitationsvorgang des Chromatins ohne Beschädigung der Faserstruktur und ohne Änderung der Ionenstärke zu verhindern, resultierten lediglich in einem beschleunigten (Agitation des Gels, Temperaturen um 30° C) oder verzögerten (Glyzerin- oder Sucrosezusatz zum Kernpuffer, tiefe Temperaturen) Reaktionsablauf des Prozesses. Nur wenn Chromatin (modifiziert nach REES et al., 1974) durch kontrollierte Behandlung mit Mikrokokkus Nuklease fragmentiert wurde, blieb es löslich. Die Mikrokokkus Nuklease erwies sich als wichtigstes Hilfsmittel für die Isolierung der Chromatinfasern unter annähernd physiologischen Salzbedingungen.

1.2. Isolierung von Chromatin nach DNS-Abbau mit Nuklease in situ

Die zuvor beschriebene Beobachtung, daß aus dem Kernverband freigesetztes Chromatin nach Nukleaseeinwirkung bei mittleren NaCl-Konzentrationen (20 - 100 mM) in Lösung gehalten werden kann, wurde zum Ausgangspunkt für die routinemäßige Gewinnung von Chromatinfragmenten. Nachstehend werden Ausbeuten und Größe derartiger Chromatinfragmente als Funktion der Abbauzeit in einem repräsentativen Abbauexperiment analysiert.

> Kerne (1.5 mg DNS/ml) wurden in 1 mM $CaCl_2$, 0.25 M Sucrose, 5 mM Tris, pH 7.5, bei 0° C mit 500 u Mikrokokkus Nuklease/mg DNS inkubiert. Aliquots wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen und die Reaktion mit demselben Volumen 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM Tris, pH 7.5 gestoppt. Nach Zentrifugation der Proben (5 min, 2000 x g) wurden die Überstände zunächst spektralphotometrisch auf ihren Chromatingehalt untersucht und anschließend zur Charakterisierung ihres Sedimentationsverhaltens in Sucrosegradienten, sowie zu DNS- und Proteinanalysen weiterverwendet.

Mit Abb. 1 werden die Ergebnisse dreier Zeitpunkte der Abbaukinetik vorgestellt: Nach 2, 6.5 und 20 min Abbauzeit wurden in den jeweiligen Überständen etwa 45, 70 bzw. 90 % des Gesamtkernmaterials als lösliches Chromatin wiedergefunden. Die entsprechenden Sedimentationsanalysen zeigen, daß mit einer Zunahme der Abbauzeit von 2 auf 6.5 min die Chromatinfragmente kleiner wurden und, daß sich auf der langsamer sedimentierenden Seite des Chromatinpeaks ein Schulter herausbildete (Abb. 1a und b). Nach Verlängerung der Zentrifugationszeit bei gleichbleibender Rotorgeschwindigkeit ließ sich das langsam sedimentierende Material des 20 min-Überstandes in eine Serie distinkter Peaks auftrennen. Diese konnten anhand der S-Werte (11 S, 15 S, 18 S, 22.5 S usw.) sowie Größe und Bandenmuster der DNS (200, 400, 600 Basenpaare usw.) nach Agarose-Gel-Elektrophorese (Abb. 2) als mono-, di- und oligomere Einheiten der nukleosomalen Grundstruktur des Chromatins identifiziert werden.

Um die Größenänderung des Chromatins nach Nukleasebehandlung anschaulicher machen zu können, wurde der mittlere Sedimentationskoeffizient (Massenmittel) der Fragmente eines jeden Gradienten mittels eines parallel zentrifugierten Markers (28 S rRNS) bestimmt. Für die in Abb. 1 gezeigten Abbauexperimente wurden auf diese Weise nach 2, 6.5 und 20 min S-Werte von etwa 87, 55 und 50 S ermittelt.

In Abb. 3 sind die Ausbeuten und Fragmentgrößen des löslichen Chromatinanteils nach verschiedenen Inkubationszeiten der Zellkerne mit Mikrokokkus Nuklease graphisch dargestellt. Alle Experimente wurden unter den oben genannten Enzym- und Salzbedingungen durchgeführt. Aus dem Diagramm geht hervor, daß der Zuwachs an löslichem Chromatin (o - o) mit einer zunehmenden Verkürzung der Fragmentlänge (x - - x) verbunden ist. Für präparative Zwecke läßt sich dar-

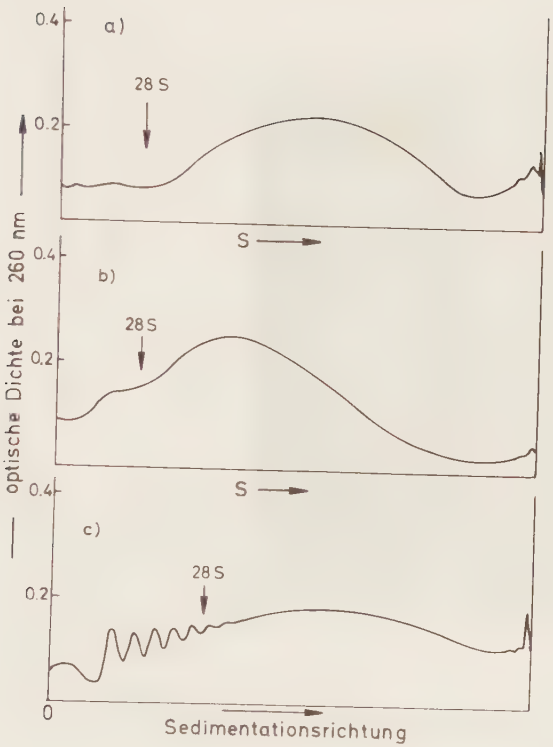

Abb. 1

Sedimentationsprofile von Chromatinfragmenten, die nach verschiedenen Inkubationszeiten mit M. Nuklease (500 u/mg DNS) in STE-Puffer (70 mM NaCl, 5 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7.5) isoliert wurden:

a) 2 min, b) 6.5 min und c) 20 min;

Zentrifugationsbedingungen: a) und b) 2.5 h, c) 4 h bei jeweils 39.000 Upm (SW40-Rotor).

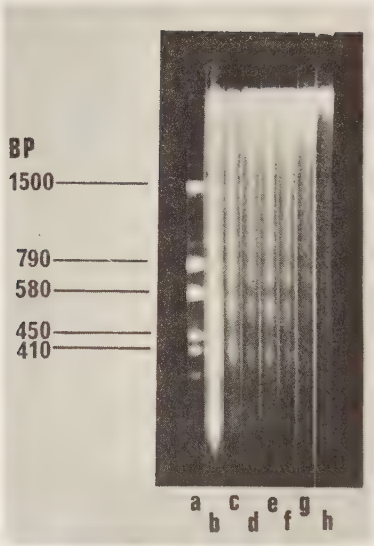

Abb. 2

DNS-Agarose-Gele von Chromatinfragmenten nach verschieden langen Inkubationszeiten mit M. Nuklease (Abbaubedingungen wie bei Abb. 1):

a) rf FD-Marker, b) nach 20 min, c) 15 min,
d) 9 min, e) 6 min, f) 3 min,
g) 1 min h) 0 min

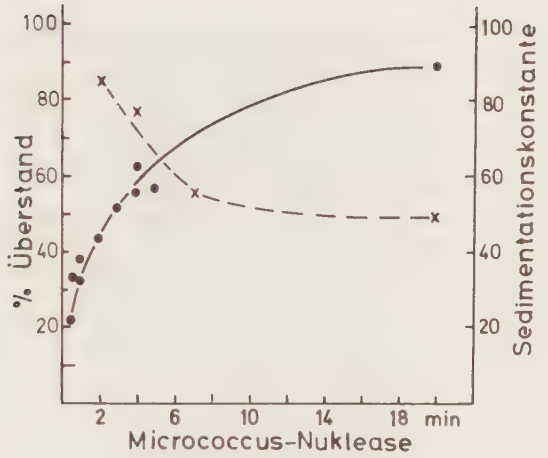

Abb. 3

Ausbeuten (≙ Anteil des Chromatins, der nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (10 min bei 10 000 x g) im Überstand bleibt) an löslichen Chromatinfragmenten (o - o) und mittlere Sedimentationskoeffizienten der Fragmente (x - x) nach verschiedenen Abbauzeiten (Abbaubedingungen wie in Abb. 1).

aus folgern, daß kleinere Fragmente in guten Ausbeuten zugänglich sind; hingegen ist die Isolierung größerer Fragmente stets mit Verlusten verbunden.

Nach kontrolliertem Abbau mit Mikrokokkus Nuklease werden die Fragmente nicht stufenlos bis zu den kleinsten multiplen Einheiten der nukleosomalen Chromatinstruktur (Mono-, Di-, Trimere usw.) abgebaut. Vielmehr bilden sich zunächst im Sedimentationsbereich bei etwa 50 S Zwischenprodukte (siehe Abb. 3, x - - x), die in einer Folgereaktion in kleinere Fragmente weiterzerfallen. Mit diesem Vorgang kann wahrscheinlich die bimodale Chromatinverteilung in den

Gradienten der Abb. 1b und 1 c erklärt werden. Der stufenweise Abbau des Chromatins scheint offensichtlich auf eine stufenweise Abfaltung der DNS und damit auf das Vorkommen von Überstrukturen hinzuweisen.

Um abzusichern, daß die Solubilisierung des Chromatins ausschließlich eine Folge der Fragmentierung und nicht etwa proteolytischer Nebenreaktionen ist, wurden die Kernproteine vor und nach Nuklease-behandlung durch SDS-Acrylamid-Elektrophorese analysiert. Abb. 4 zeigt, daß die Proteinmuster beider Experimente identisch sind, und keine nennenswerte Degradationsprodukte - speziell im Histonbereich - auftreten.

2. Struktur und Eigenschaften von löslichem Chromatin

2.1. Elektronenmikroskopische Strukturuntersuchung von Chromatinfasern

Für die elektronenoptischen Untersuchungen wurden die Ficoll-Technik nach MOSES und SOLARI (1976) und insbesondere die Negativ-Kontrastierung mit Uranyl-Acetat (SOLARI, 1972; RIS, 1975) angewandt. Das Prinzip dieser Techniken beruht darauf, daß die Fasern in eine schützende Matrix eingebettet werden, und dadurch eine Bildung artifizieller Strukturen während der Dehydratation am ehesten verhindert wird. Bei beiden Methoden kann man auf den Gebrauch von organischen Lösungsmitteln (z.B. Äthanol oder Amylacetat), in deren Gegenwart die DNS kollabiert (LANG, 1969) bzw. die Struktur des Chromatins irreversibel geändert wird, verzichten.

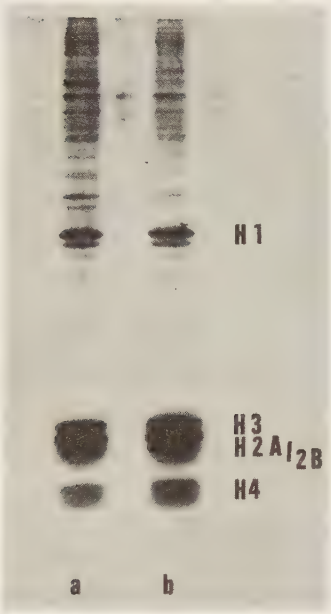

Abb. 4

SDS-Acrylamid-Gel-Elektrophorese von Chromatinfragmenten vor (a) und nach (b) M. Nukleasebehandlung.

Als Objektträger wurden dünne, hydrophile Kohlefilme gewählt (siehe MATERIAL UND METHODEN). Durch die hydrophile Eigenschaft der Kohleoberfläche sollte eine gute Haftung und damit gleichmäßige Verteilung der Fasern gewährleistet sein. Die geringe Schichtdicke des Kohlefilms sollte eine kontrastreiche Darstellung der Fasern ermöglichen.

2.1.1. Faserstruktur in Lösungen niedriger NaCl-Konzentration (10 mM)

Zunächst wurden Eignung und Qualität des Negativ-Kontrast-Verfahrens und der Ficoll-Technik in Bezug auf Kontrast und Strukturerhaltung der Chromatinfasern untersucht. Des weiteren wurden Bedingungen ausgearbeitet, unter denen eine optimale Adsorption und Dispersion der Fasern auf dem EM-Träger (Netzchen) gewährleistet sind. Als Testobjekt wurden Chromatinfasern in Lösungen niedriger NaCl-Konzentration (0 - 10 mM NaCl) gewählt, deren Struktur durch andere Untersuchungen bereits bekannt war. Unter den genannten Ionenbedingungen liegen die Fasern als extendierte Nukleosomenketten vor (WOODCOCK, 1973; OLINS et al., 1974; OUDET et al., 1975).

Negativkontrastierung mit Uranyl-Acetat:

In Abb. 5 sind Ausschnitte von Fasern dargestellt, die direkt nach Lyse von Kernen (30 µg DNS/ml) in 0.2 mM EDTA, pH 7.5, präpariert und mit Uranyl-Acetat gefärbt wurden. Auflösung und Kontrastierung der Faserstruktur sind ausreichend gut, um die typische Nukleosomenkonfiguration mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 85 Å erkennen zu können. Nackte DNS-Bereiche und Regionen mit Nukleosomenverdichtung entlang der Faserkontur zeigen allerdings, daß die Strukturerhaltung nicht ausreichend ist (Abb. 5a). Die starke Ausrichtung (Abb. 5b) und ungleichmäßige Dispersion der Fasern auf dem Trägerfilm deuten darauf hin, daß die Adsorptionskraft der Kohleoberfläche unter den herrschenden Ionenbedingungen nur für eine lockere Bindung der Fasern ausreichte.

Weitere Experimente, die mit Chromatin bei 0 - 10 mM NaCl in TE-Puffer (0.5 mM TEA, 0.5 mM EDTA, pH 7.5) durchgeführt wurden,

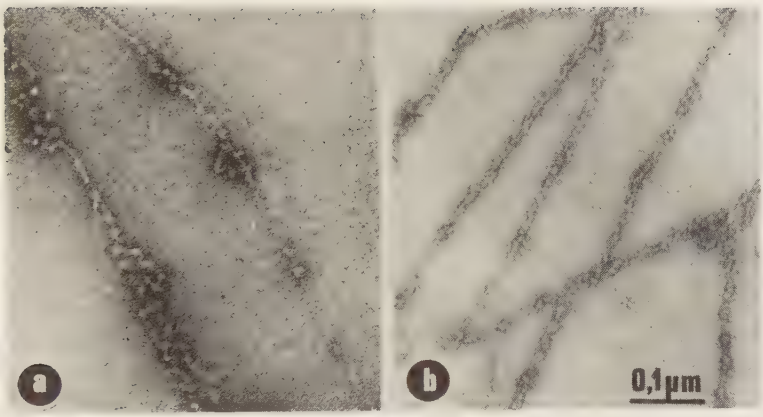

Abb. 5

Kernlysate in Gegenwart von 0.2 mM EDTA (pH 7.5) gespreitet und mit Uranyl-Acetat negativ gefärbt. Unter a) sind Faserausschnitte mit extrem unterschiedlicher Nukleosomendichte (nackte DNS und partiell aggregierte Nukleosomen) dargestellt; die Fasern sind, wie unter b) noch einmal verdeutlicht wird, stark ausgerichtet (Vergrößerung: 120 000-fach).

zeigten, daß die Fasern mit zunehmender NaCl-Konzentration gleichmäßiger über den Trägerfilm verteilt waren und zudem keine Vorzugsrichtung mehr aufwiesen. Zusätzlich stieg bei 10 mM NaCl die Anzahl der am Träger gebundenen Moleküle etwa um das 10 - 20-fache (verglichen mit den Präparationen bei 0.2 mM EDTA). Aus diesen Beobachtungen läßt sich ableiten, daß die Interaktion zwischen Chromatinfasern und Trägerschicht ionenstärken-abhängig ist.

Um die Wechselwirkung zwischen Kohleoberfläche und Chromatinfasern bei höheren Ionenstärken verfolgen zu können, wurden Kernlysate zunächst bei niederen NaCl-Konzentrationen (< 10 mM) (0.2 - 0.5 % GA, 3 h, 0° C) fixiert und anschließend mit Ammonium-Acetat $(NH_4)Ac$ versetzt.

Durch den Fixierungsschritt wurde erreicht, daß die Nukleosomenstruktur der Fasern auch bei nachträglicher Änderung der Salzkonzentration erhalten blieb. Anstelle von NaCl wurde zur Erhöhung der Ionenstärke des Präparationspuffers NH_4Ac verwendet, da dieses Salz während des Trocknungsprozesses auf dem EM-Träger keine strukturüberlagernde Kristalle bildet. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen zwischen NH_4Ac und Glutaraldehyd wurden die fixierten Lösungen vor der Salzzugabe entweder stark ausverdünnt (GA $\leq$ 0.005 %, 1 - 3 µg DNS/ml) oder gegen TE-Puffer dialysiert. In Abb. 6a - d sind in TE fixierte Fasern aus Kernlysaten bei 0, 10 und 30 mM NH_4Ac dargestellt. Aus den Bildern geht hervor, daß die Ionenstärke nicht nur die Bindungseigenschaften des Kohleträgers, sondern auch die Spreitung der Fasern selbst beeinflußt: Bei 0 mM NH_4Ac (Abb. 6a und b) sind die Fasern aggregationsartig zusammengelagert. Die Nukleosomen liegen dicht aneinandergereiht, so daß keine internukleosomale DNS-Regionen erkennbar sind. Zwischen 5 und 15 mM NH_4Ac (Abb. 6c, 10 mM) sind die Fasern zwar immer noch stark verkürzt, sie haben sich allerdings aus ihrer Verknäuelung gelöst und beginnen sich zu strecken. Ab etwa 20 mM NH_4Ac (Abb. 6d) ist die charakteristische "Perlenketten"-Konfiguration des Chromatins zu erkennen. Die Fasern sind, ohne eine Vorzugsrichtung zu zeigen, gleichmäßig über den Trägerfilm gespreitet. Die Anzahl der am Träger gebundenen Moleküle vergrößerte sich noch einmal um den Faktor 4 - 5.

Im Vergleich zu den bisherigen EM-Abbildungen, in denen Chromatinfasern nach direkter Lyse von Kernen dargestellt sind, werden in Abb. 6e nukleasebehandelte Fasern gezeigt, die bei 10 mM NaCl in TE-Puffer fixiert und anschließend mit 30 mM NH_4Ac versetzt wurden. Wie aus den Abbildungen 6c und 6e zu entnehmen ist, sind die Strukturen der beiden Präparationen identisch; d.h., die Konformation der enzyma-

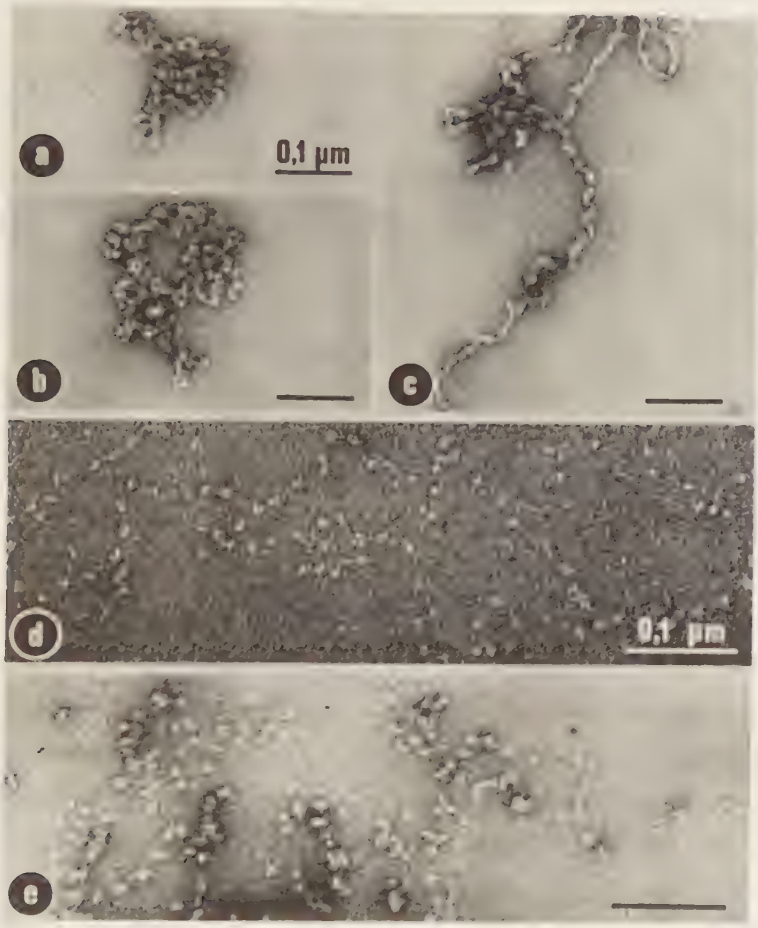

Abb. 6

Kernlysate (a - d) wurden in TE-Puffer (0.5 mM TEA, 0.5 mM EDTA, pH 7.5) mit 0.2 % Glutaraldehyd fixiert (3 h, 0° C) und in Gegenwart unterschiedlicher NH_4-Acetat-Konzentration gespreitet:

a) und b) 0 mM, c) 10 mM und d) 30 mM NH_4Ac.

In e) sind nukleasebehandelte Chromatinfragmente (350 u./mg DNS, 3 min) dargestellt, die bei 10 mM NaCl in TE-Puffer wie oben fixiert und in Gegenwart von 30 mM NH_4-Acetat gespreitet wurden. Alle Präparate sind mit Uranyl-Acetat negativ gefärbt.
Vergrößerungen: a) - c) x 120.000;
d) und e) x 180.000.

tisch gewonnenen Chromatinfasern hat sich - sofern das mit EM-Methoden feststellbar ist - weder durch die Nukleasebehandlung noch durch die etwas höhere Ionenstärke (10 mM NaCl) geändert.

Ficoll-Technik:

Bei der Uranyl-Acetat-Färbung geht die negativ geladene DNS Komplexverbindungen mit Uranyl-Ionen ein. Sie ist deshalb nach Negativkontrastierung - siehe bisherige Abbildungen -, bei der ungefärbte Moleküle (z.B. positiv geladene Nukleosomen) hell abgehoben in einer kontrastreichen (dunklen) Schicht überschüssigen Uranyl-Acetats eingebettet liegen, schwer erkennbar. Wäscht man das ungebundene Uranyl-Acetat aus, erscheint die DNS dunkel (positiv kontrastiert) gegen einen hellen Hintergrund. In Abb. 7a sind Chromatinfasern in 0.2 mM EDTA, pH 7.5, im Positiv-Kontrast dargestellt. Zwischen den nun etwas kontrastärmeren Nukleosomen ist die DNS als dünner Faden zu erkennen.

Dem Vorteil dieser Technik, nämlich DNS innerhalb der Chromatinstruktur optisch hervorzuheben, steht ein großer Nachteil gegenüber. Nach dem Ausschwemmen des ungebundenen Uranyl-Acetats sind die Fasern während des Trocknungsprozesses nicht mehr geschützt und werden infolge der Oberflächenspannungskräfte meistens bis zur Unkenntlichkeit verklumpt. Um die positiv kontrastierten Chromatinfasern besser schützen zu können, wurden sie mit einer elektronentransparenten Ficollschicht (1 % Ficoll in 1 % wässriger DMSO-Lösung) überzogen. Das Ficoll hüllt die Fasern während der Lufttrocknung in ein dichtes Netzwerk ein und bewahrt dadurch die Struktur des Präparats vor Trocknungsartefakten. In Abb. 7b sind Chromatinfasern in 0.2 mM EDTA, pH 7.5, nach der Ficoll-Technik dargestellt. Obwohl der Kontrast in diesen Bildern als Folge der Ficoll-Technik sehr schwach ist, sind

Nukleosomen mit einem Partikeldurchmesser von 80 - 90 Å zu erkennen.

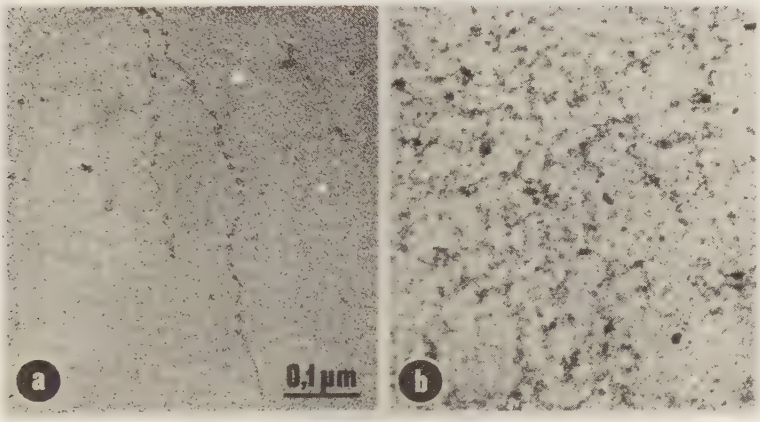

Abb. 7

Chromatinfaser in Gegenwart von 0.2 mM EDTA (pH 7.5) mit Uranyl-Acetat positiv kontrastiert und

a) luftgetrocknet bzw.
b) nach der Ficoll-Methode getrocknet.

Vergrößerung: 120.000-fach

2.1.2. Faserstruktur in Lösungen mittlerer NaCl-Konzentrationen (70 mM)

Die Experimente mit Chromatin bei niederer Ionenstärke haben gezeigt, daß es gelungen ist, die Negativ-Kontrastierung mit Uranyl-Acetat für die elektronenoptische Wiedergabe des Chromatins anstelle der bisher verwendeten Miller- und Amylamin-Techniken einzusetzen. Gute Konservierung der Faserstruktur, sowie eine für Strukturanalysen ausreichend gute Objekt-Kontrastierung und -Auflösung waren das Resulta

In Abb. 8 sind Chromatinpräparationen in Lösungen mittlerer NaCl-Konzentrationen (80 mM) mit dem Negativ-Kontrastverfahren dargestellt.

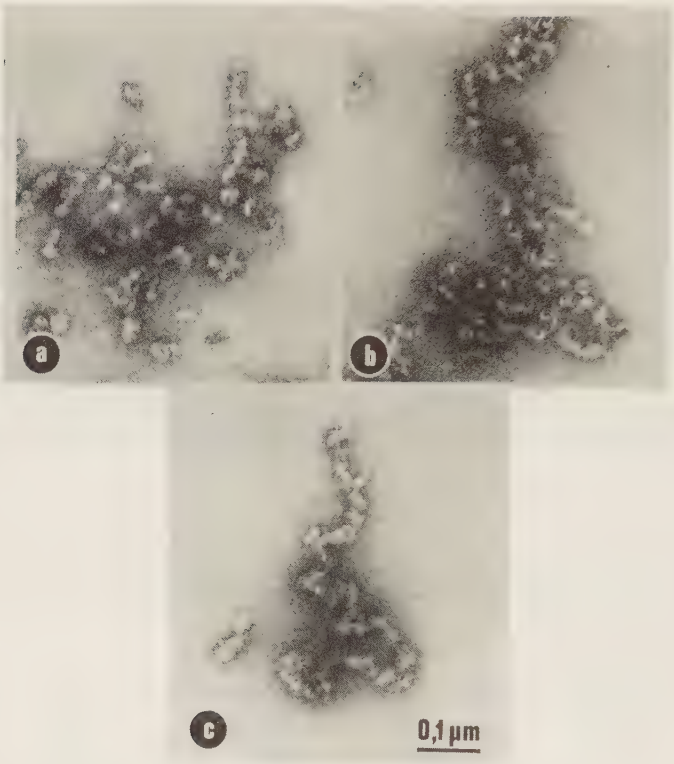

Abb. 8

Nukleasebehandelte Chromatinfasern (500 u/mg DNS, 2 min) in STE-Puffer wurden mit Glutaraldehyd (0.5 %, 2.5 h bei 0° C) fixiert. Aliquots wurden

a) gegen 0.2 mM EDTA (pH 7.2) bzw.
b) 1 mM EDTA, 1 mM Na-Phosphat (pH 6.88) dialysiert;
c) ein Teil der gegen Phosphat-Puffer dialysierten Proben wurde mit 30 mM NH_4-Acetat versetzt.

Die Fasern wurden in den jeweiligen Puffern für die El.-Mikroskopie präpariert und mit Uranyl-Acetat negativ gefärbt.
Vergrößerung: 120.000-fach

Eine Kernsuspension wurde (1.5 mg DNS/ml) nach 2 min Verdauzeit mit 500 u Mikrokokkus Nuklease/mg DNS mit demselben Volumen 140 mM NaCl, 5 mM TEA, 5 mM EDTA, pH 7.2, versetzt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (5 min bei 2.000 x g) wurde der lösliche Chromatinanteil (380 µg DNS/ml ≙ 50 % Ausbeute) mit 0.5 % Glutaraldehyd 2.5 h bei 0° C fixiert. Anschließend wurden Aliquots gegen 0.2 mM EDTA (pH 7.2 und gegen 1 mM EDTA, 1 mM Na-Phosphat (pH 6.88) (EP-Puffer) dialysiert. Nach der Dialyse wurde ein Teil der Chromatinfasern in EP-Puffer mit NH_4Ac auf eine Endkonzentration von 30 mM gebracht.

Wie aus den EM-Bildern hervorgeht, unterscheidet sich die Chromatinstruktur bei höheren Ionenstärken erheblich von der "Perlenketten"-Struktur bei niederem Salz. In den Fasern kann man kompakte globuläre Strukturen erkennen, die dicht nebeneinander angeordnet sind. Ihr Durchmesser variiert zwischen 180 und 210 Å. Dadurch erhält die Faser ein unregelmäßiges Aussehen.

Die Behandlung der Fasern mit Glutaraldehyd ist ausreichend, um die Struktur der 200 Å-Fasern irreversibel zu fixieren, so daß nachfolgende Änderungen der Ionenkonzentration keine Konformationsänderungen der Fasern nach sich ziehen.

Die Dispersion und Spreitung der fixierten Fasern auf den kohlebeschichteten Netzchen scheint nicht mehr in dem Maße von der Ionenstärke des Präparationspuffers abzuhängen, wie es für die Nukleosomenstruktur des Chromatins zu beobachten war. Mit zunehmender Ionenstärke änderte sich jedoch noch die Anzahl der adsorbierten Moleküle auf der Trägerschicht (Zunahme etwa 20-fach).

Während die Fixierung des Chromatins bei niederem Salz zur Darstellung der Nukleosomenstruktur nicht unbedingt erforderlich ist

(0.2 mM EDTA), muß sie zur Strukturerhaltung der 200 Å-Faser auf jeden Fall durchgeführt werden.

Eine analoge Chromatinpräparation wie im obigen Kapitel wurde zur Hälfte fixiert bzw. nicht fixiert. Die fixierte Probe wurde zur Entfernung des Glutaraldehyds gegen denselben Puffer dialysiert (70 mM NaCl, 5 mM TEA, 5 mM EDTA, pH 7.2). Anschließend wurde das NaCl der fixierten und unfixierten Probe gegen 70 mM NH_4Ac, 0.5 mM Na-Phosphat, pH 6.88, ausgetauscht. Beide Präparate wurden auf Netzchen übertragen, isoton gewaschen (siehe METHODEN) und mit Uranyl-Acetat gefärbt.

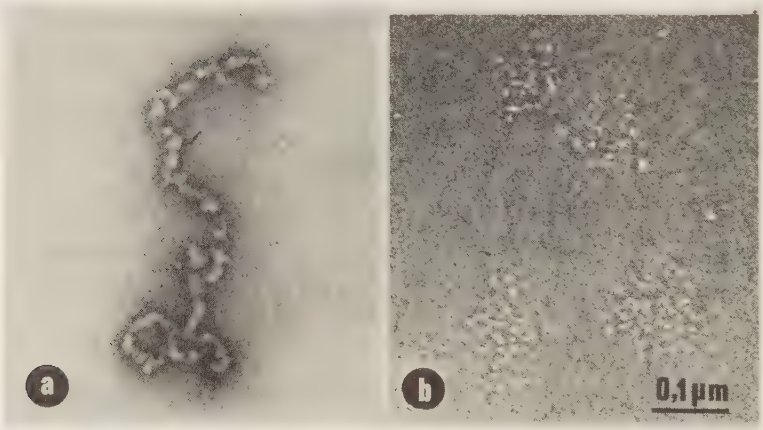

Abb. 9

Chromatinfasern (Abbaubedingungen wie in Abb. 8) wurden in STE-Puffer (70 mM NaCl)

a) fixiert bzw. b) nicht fixiert,

in Gegenwart von 70 mM NH_4-Acetat, 0.5 mM Na-Phosphat (pH 6.88) gespreitet, isoton gewaschen und mit Uranyl-Acetat negativ kontrastiert.
Vergrößerung: 120.000-fach)

In Abb. 9 sind eine fixierte und unfixierte Probe wiedergegeben: Das fixierte Präparat zeigt die typische 200 Å-Feinstruktur (Abb. 9a); hingegen ist die Struktur der unfixierten Probe in kleine Partikel zerfallen, die ihrer Größe nach (85 Å) Nukleosomen darstellen könnten (Abb. 9b).

2.1.3. Die 200 Å-Faser

Da es denkbar ist, daß die Struktur der löslichen Chromatinfragmente durch die Nukleasebehandlung artifiziell ist, wurden zum morphologischen Vergleich Experimente durchgeführt, die eine elektronenmikroskopische Strukturanalyse der nicht mit Nuklease behandelten Interphasechromatinfasern erlauben.

Eine der möglichen Präparationstechniken ist die Oberflächenspreitung von Kernen (GALL, 1966; MEYER und HENNIG, 1974). Bei dieser Technik wird der Effekt ausgenützt, daß Kerne nach Kontakt mit einer Wasseroberfläche in der Luft-Wasser-Interphase lysieren, und das freigesetzte Chromatin in einem Film aus Kernproteinen über die Wasseroberfläche gespreitet wird. Die Chromatinfasern müssen innerhalb von 10 sec mit einem EM-Objektträger abgenommen werden, weil die chromatingebundenen Ionen, insbesondere die zweiwertigen, allmählich in die wäßrige Phase diffundieren, und dadurch die Konformation des Chromatins in Richtung auf die 85 Å-Fibrille geändert wird. In Abb. 10 sind ficollpräparierte Chromatinfasern nach Oberflächenspreitung (Abb. 10a) und aus Lösung nach Nukleasebehandlung (Abb. 10b) gegenübergestellt. Beide Präparate zeigen dieselbe Faserstruktur mit einem mittleren Durchmesser von 210 Å. Der globuläre Aufbau des Chromatins kommt in Abb. 10a besonders zur Geltung, da die Fasern durch den Spreitvorgang etwas gestreckt sind.

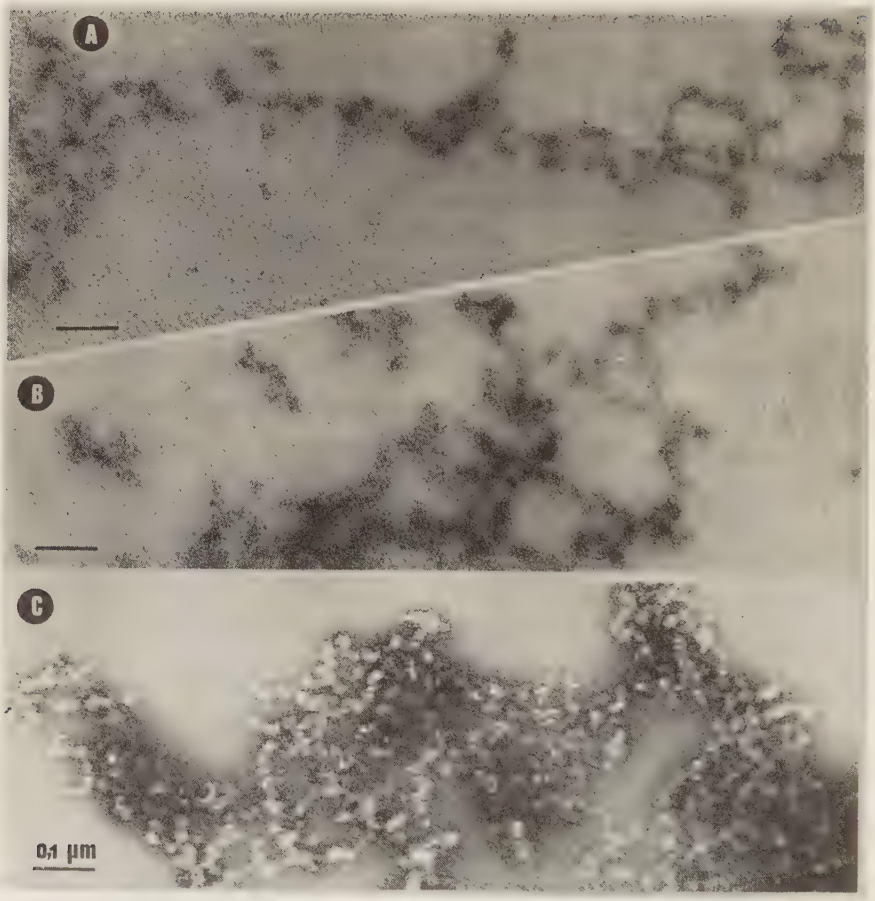

Abb. 10

a) Oberflächengespreitete Chromatinfasern und
b) Fasern nach Nukleasebehandlung (Verdaubedingungen wie in Abb. 8) nach positiv Kontrastierung mit Uranyl-Acetat nach der Ficoll-Technik getrocknet.
c) In situ fixierte Chromatinfasern (140 mM NaCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 10 mM TEA, pH 7.2) wurden gegen 1 mM EDTA, pH 7.5, dialysiert, gespreitet und mit Uranyl-Acetat negativ gefärbt.
Vergrößerung: 120.000-fach.

In einem weiteren Experiment wurde Chromatin in intakten Kernen bei 140 mM NaCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 10 mM TEA, pH 7.5, mit Glutaraldehyd fixiert und gegen 1 mM EDTA, pH 7.5, dialysiert (Abb. 10c). Die Fasern zeigen nach Negativkontrastierung mit Uranyl-Acetat dieselbe Morphologie wie in Abb. 8a - c und 10a und b.

Aufgrund der morphologisch identischen Strukturen der Gesamtchromatinfasern und der Fasern, die nach enzymatischer Fragmentierung bei hohem Salz löslich sind, kann man wahrscheinlich annehmen, daß die Struktur der 200 Å dicken Chromatinfaser nach limitierter Nukleasebehandlung erhalten bleibt.

2.2. Sedimentations- und Histon-Analysen

2.2.1. Sedimentationsverhalten von Chromatinfragmenten in Lösungen mittlerer (80 mM) und niederer (5 mM) NaCl-Konzentrationen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben, daß die Chromatinfasern in Lösungen niedriger (0 - 10 mM) und mittlerer (70 mM) NaCl-Konzentrationen bestimmte, morphologisch unterscheidbare Konformationen einnehmen. Diese Konformationsunterschiede äußern sich im wesentlichen durch den veränderten Kondensationsgrad der Nukleosomenfibrille. Da sowohl die molekulare Zusammensetzung als auch die Kettenlänge des Chromatins konstant gehalten werden können, müßte es möglich sein, die ionenabhängige Auf- und Entfaltung (200 bzw. 85 Å) der Faser durch ihr verändertes Sedimentationsverhalten nachweisen zu können.

Lösliche Chromatinfragmente (350 u Mikrokokkus Nuklease/mg DNS, 80 % Ausbeute) wurden in 80 mM bzw. nach Dialyse in 5 mM NaCl (jeweils in 1 mM Na-Phosphat, 0.2 mM EDTA, pH 6.88) durch 10 - 30 % Sucrosegradienten 4.5 h bei 39.000 Upm zentrifugiert. Während der Fraktionierung der Gradienten (22 Fraktionen à 0.6 ml pro Gradient) wurde die optische Dichte bei 254 nm kontinuierlich bestimmt.

In Abb. 11 sind die Sedimentationsprofile von Chromatinfibrillen bei 80 mM (Abb. 11a) und 5 mM NaCl (Abb. 11b) aufgezeichnet. Aus den Graphiken kann man ersehen, daß die Hauptpopulation der Fragmente bei höherem Salz schneller (57 S) sedimentiert als bei niederem (33 S). Größenanalysen der DNS in den verschiedenen Fraktionen der Gradienten zeigen, daß Chromatinfragmente mit identischem Sedimentationsverhalten bei 5 mM NaCl aus längeren Nukleosomenketten (Abb. 12a) bestehen als bei 80 mM NaCl (Abb. 12b). Beispielsweise enthalten Fragmente der Fraktion 8 (etwa 31 - 35 S) bei 5 mM NaCl 8 - 10 Nukleosomen (Abb. 12a) und bei 80 mM NaCl 5 - 6 Nukleosomen (Abb. 12b). Da sich die molekulare Zusammensetzung mittelgroßer und großer Chromatinfragmente (siehe Kapitel 2.2.2.) in NaCl-Lösungen mit Konzentrationen unter 0.5 M nicht wesentlich ändert, können die Ergebnisse der Sedimentations- und Größenanalysen der Faserfragmente nur so interpretiert werden, daß die Fasern - analog zu den elektronenmikroskopischen Beobachtungen (Kapitel 2.1.) - in Lösungen niederer NaCl-Konzentrationen (z.B. 5 mM) als extendierte Nukleosomenketten vorliegen, während sie in Lösungen mittlerer NaCl-Konzentrationen (z.B. 80 mM) zu einer kompakteren Struktur abgefaltet sind.

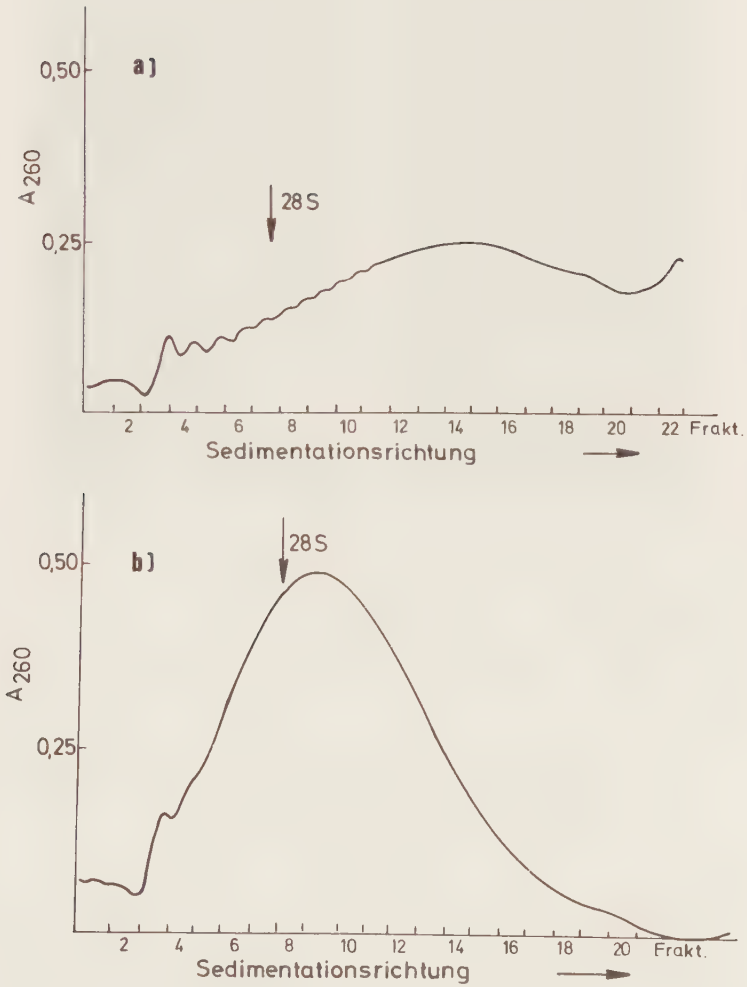

Abb. 11

Sedimentationsprofile von Chromatinfragmenten bei
a) 80 mM NaCl bzw.
b) 5 mM NaCl (1 mM Na-Phosphat, 0.2 mM EDTA, pH 6.88) nach Zentrifugation durch 10 - 30 %-ige Sucrosegradienten (4.5 h, 39.000 Upm, SW40-Rotor).

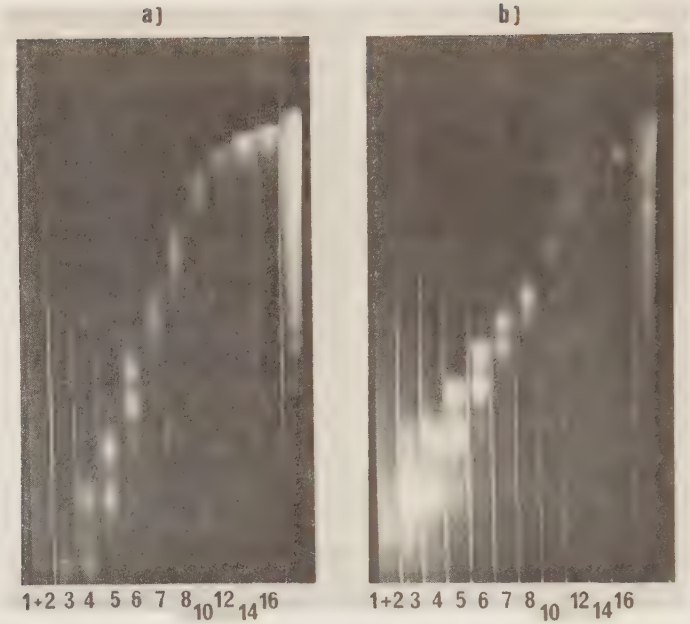

Abb. 12

Agarose-Gel-Elektrophoresen zur Analyse der DNS-Fragmentgrößen in den oben angegebenen Fraktionen der Sucrosegradienten bei

a) 5 mM NaCl bzw.
b) 80 mM NaCl (in jeweils 1 mM Na-Phosphat, 0.2 mM EDTA, pH 6.88).

2.2.2. Histonanalysen von verschieden großen Chromatinfragmenten in Lösungen mittlerer (80 mM) und niederer (5 mM) NaCl-Konzentrationen

RENZ und DAY (1976) wiesen nach, daß H1 in Lösungen mittlerer NaCl-Konzentration kooperativ und in Lösungen niederer NaCl-Konzentrationen nichtkooperativ an DNS bindet. Die Kooperativität der DNS-H1-Bindung spiegelt sich in dem Befund wieder, daß die Histonmoleküle bevorzugt an große DNS-Fragmente gebunden haben. Sind die H1-Moleküle jedoch nichtkooperativ an die DNS gebunden, verteilen sie sich gleichmäßig auf DNS-Fragmente aller Größen. Nun ist es denkbar, daß H1 nicht nur an DNS sondern auch an Nukleosomenketten

kooperativ und nichtkooperativ binden kann. Im Experiment würde sich eine kooperative Bindung des Histons H1 durch seine größere Affinität zu längeren Nukleosomenketten darstellen.

> Es wurde so verfahren, daß die verschiedenen Größenklassen der Chromatinfragmente (siehe Abb. 12b) in den Fraktionen des 80 mM NaCl-Gradienten (Abb. 11a) elektrophoretisch (SDS-Acrylamid-Gele) auf ihre Histonzusammensetzung untersucht wurden. Die im Gel aufgetrennten Proteine (Abb. 13a) wurden anschließend densitometrisch ausgewertet und das Verhältnis von Histon H1 zu Gesamthiston als Funktion der Kettenlänge der Fragmente aufgezeichnet.

Aus Abb. 13a geht hervor, daß alle Fragmente unabhängig von ihrer Größe den vollen Besatz an H3, H2A, H2B und H4 haben. Der Histon-H1-Gehalt dagegen variiert beträchtlich und hängt eindeutig von der Kettenlänge der Fragmente ab. Der Graphik in Abb. 14 (o - o) kann man entnehmen, daß das Verhältnis von H1 zu Gesamthiston ab etwa 6 - 8 Nukleosomen pro Fragment konstant ist. Bei den kleineren Fragmenten (< 5 Nukleosomen) hingegen nimmt der Gehalt an H1 mit der Nukleosomenzahl stark ab.

Sofern diese Beobachtung ein Hinweis dafür ist, daß H1 präferentiell an größere Fragmente bindet, sollte diese Art der Bindung eine Funktion der hohen Salzkonzentration (> 40 mM NaCl) sein. Nach Dialyse gegen Lösungen niederer (5 mM) NaCl-Konzentration (siehe Abb. 11b und 12a) müßte bei großen und kleinen Fragmenten das gleiche Verhältnis von H1 zu Gesamthiston auftreten. D.h., H1 müßte bei 5 mM NaCl nichtkooperativ an die extendierten Nukleosomenketten binden; die Folge wäre, daß alle H1 Moleküle gleichmäßig auf alle Fragmente verteilt wären.

Abb. 13

Proteinanalysen (SDS-Acrylamid-Elektrophorese) der oben angegebenen Fraktionen aus dem

a) 80 mM bzw. b) 5 mM NaCl-Gradienten.

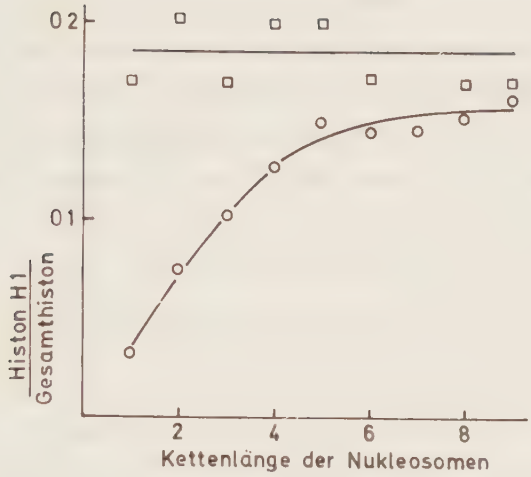

Abb. 14

Verhältnis von H1 zu Gesamthiston in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Nukleosomen bei 5 mM NaCl (□ - □) und bei 80 mM NaCl (o - o).

Ein Vergleich der Proteinbanden in Abb. 13 zeigt, daß bei 5 mM NaCl auch noch in den kleinsten Fragmenten (Fraktion 3 und 4 ≙ 1 - 2 Nukleosomen) H1 deutlich nachweisbar war. Noch überzeugender kommt die Gleichverteilung der H1-Moleküle in Abb. 14 (□ - □) zum Ausdruck: Das Verhältnis von Histon H1 zu Gesamthiston ist in allen Fragmenten unabhängig von deren Größe gleich.

Mit dem Nachweis der bei 80 mM NaCl beobachteten Bindungspräferenz von H1 an Nukleosomenketten, die aus mehr als 6 - 8 Nukleosomen bestehen, und der bei 5 mM NaCl beobachteten gleichmäßigen Verteilung der H1-Moleküle auf alle Fragmente kann mit einiger Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß Histon H1 auch an Nukleosomenketten

kooperativ bzw. nichtkooperativ bindet. Des weiteren kann man annehmen, daß die Ab- oder Entfaltung der Nukleosomenketten die Folge einer (ionenabhängigen) kooperativen bzw. nichtkooperativen Bindung des H1 ist. (Weitere Experimente, die auf eine präferentielle - und damit kooperative - Bindung des H1 an größere Fragmente hinweisen, werden in Kapitel 2.3. diskutiert.)

2.2.3. Entfaltung der 200 Å-Faser zur 85 Å-Faser

Aus dem bisherigen Teil der Arbeit geht hervor, daß Chromatinfasern, die in Lösungen niederer NaCl-Konzentrationen (0 - 10 mM) in der bekannten 85 Å-Struktur vorliegen, nach ihrer Isolierung bei mittleren Salzkonzentrationen (60 - 80 mM NaCl) die bereits beschriebene, stärker abgepackte 200 Å-Struktur einnehmen. Die kondensierte 200 Å-Faser muß demnach irgendwo in dem Salzbereich zwischen 60 und 10 mM NaCl zur 85 Å-Faser entfaltet werden. Das nun beschriebene Experiment soll eine genauere Kenntnis des Salzbereichs vermitteln, in dem die Entfaltung der kondensierten Faser geschieht.

> Große Chromatinfragmente wurden nach einem 2 min-Abbau mit 350 u Mikrokokkus Nuklease/mg DNS (50 % Ausbeute) gegen verschiedene Salzkonzentrationen zwischen 60 und 10 mM NaCl in jeweils 1 mM Phosphat, 0.2 mM EDTA, pH 6.88, dialysiert. Nach Zentrifugation der Chromatinlösungen durch Sucrosegradienten (15.400 Upm, 15 h) wurde der jeweilige mittlere Sedimentationskoeffizient (Gewichtsmittel) der Chromatinfragmente mittels eines 28 S-Markers bestimmt.

In Abb. 15 sind die mittleren Sedimentationskoeffizienten der Chromatinfasern in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration aufge-

zeichnet. Zwischen 60 und 35 mM NaCl ändern sich die S-Werte der Chromatinfragmente nur unwesentlich. Nach einer weiteren Verringerung der Salzkonzentration fallen die S-Werte in einem engen Bereich zwischen 35 und 15 mM drastisch von 88 auf 54 S ab. Die Beobachtung, daß die 200 Å-Faser in einem engen Salzbereich zur 85 Å-Faser entfaltet wird, kann als ein weiterer Hinweis auf die kooperative Funktion des H1 beim Aufbau der kondensierten Faser interpretiert werden.

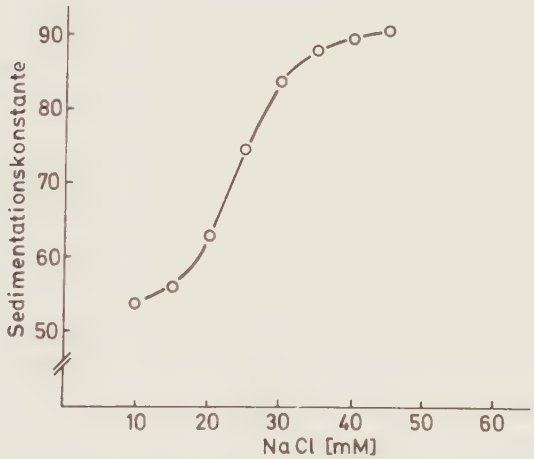

Abb. 15

Abhängigkeit der mittleren S-Werte großer Chromatinfragmente (350 µ/mg DNS Mikrokokkus Nuklease, 2 min Abbau von der NaCl-Konzentration.

Der scharfe Übergang im Sedimentationsverhalten der Chromatinfragmente im Salzbereich zwischen 35 und 10 mM NaCl kann elektronenmikroskopisch als eine zunehmende Entfaltung der kompakten 200 Å-

Faser erkannt werden, die schließlich zur nukleosomalen 85 Å-Faser führt (Abb. 16).

Kerne wurden 30 min mit 50 u Mikrokokkus Nuklease/mg DNS behandelt und durch Zugabe von STE-Puffer (40 mM NaCl, 5 mM TEA, 5 mM EDTA, pH 7.2) lysiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (10 min, 5000 x g) wurden Aliquots des löslichen Überstandes (50 % Ausbeute) gegen 40, 30, 20 und 10 mM NaCl in jeweils 0.5 mM Na-Phosphat, 0.5 mM EDTA, pH 6.88, dialysiert und anschließend mit 0.2 % Glutaraldehyd fixiert (3 h bei 0° C). Zur elektronenmikroskopischen Präparation wurden alle Proben mit 0.2 mM Na-Phosphat, pH 6.88, auf etwa 1 µg DNS/ml verdünnt ($\leq$ 1 : 100) und mit 20 mM NH_4-Acetat versetzt.

Bei 40 mM NaCl (Abb. 16a und b) lassen sich die Fasern in der bereits beschriebenen Struktur (II, 2.1.2.) darstellen. Die Fasern sind sehr kompakt, einzelne Nukleosomen sind nur gelegentlich zu erkennen. Bei 30 mM NaCl (Abb. 16c und d) ist der globuläre Aufbau der Fasern noch gut konserviert. Die Fasern sind jedoch schon etwas aufgelockert und haben nun einen maximalen Durchmesser, der im mittel bei etwa 300 Å liegt. Eine weitere Verringerung der NaCl-Konzentration von 30 auf 20 mM (Abb. 16e) ist mit einer drastischen Änderung der Faserstruktur verbunden. Die Ausbreitung der Fasern in ihrer Längs- und Querachse und die deutlich voneinander abgesetzten Nukleosomen zeigen, daß die dreidimensionale Struktur der ehemals kompakten Fasern aufgehoben ist. Bei 10 mM NaCl (Abb. 16f und g) sind die Fasern vollständig expandiert.

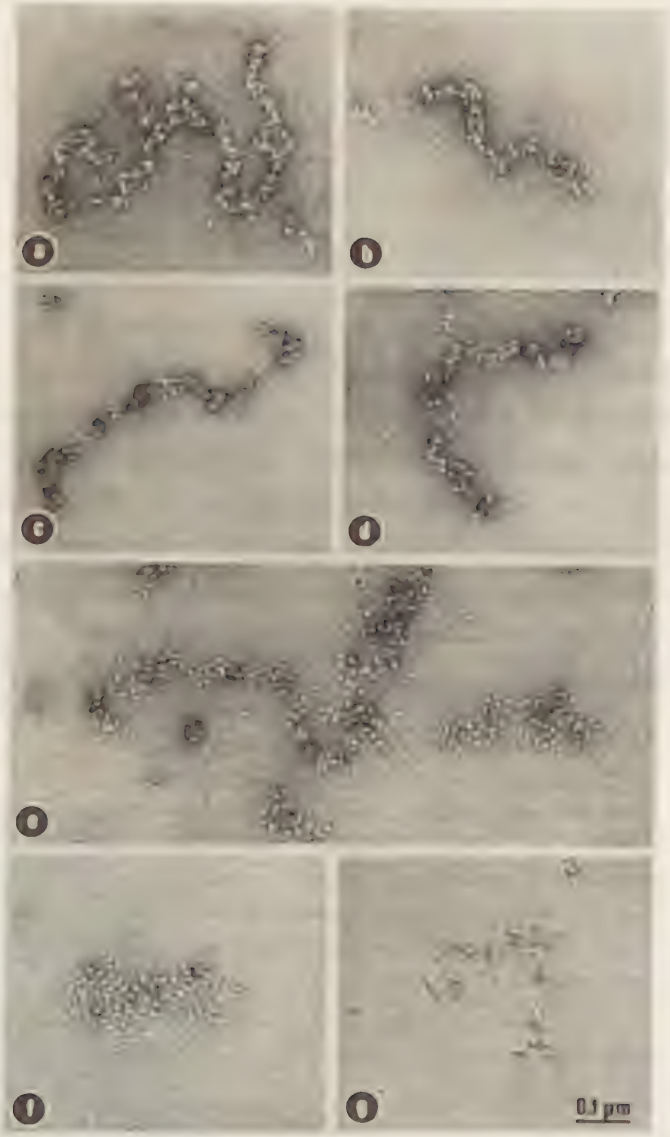

Abb. 16

Chromatinfragmente, dargestellt bei 40 mM NaCl (a und b); 30 mM NaCl (c und d); 20 mM NaCl (e), und 10 mM NaCl (f und g).
Die Präparate a - f sind negativ kontrastiert, g ist positiv kontrastiert.
Vergrößerung: 120.000-fach

2.3. Kooperative Bindung von H1 an Nukleosomenketten

2.3.1. Löslichkeit und H1-Gehalt von Chromatinfragmenten nach längerer Abbauzeit mit Nuklease

Wie bereits erwähnt wurde, ist es möglich bei limitierter Einwirkung von Mikrokokkus Nuklease auf Kerne nahezu das gesamte Chromatin ($\geq$ 90 %) in Lösung zu bringen. Nach längerem Abbau mit Mikrokokkus Nuklease zeigt sich ein bisher nicht erwähntes Phänomen: Der Anteil an löslichem Chromatin nimmt wieder ab. Mit der Zunahme an unlöslich gewordenem Material wurde dabei in der löslichen Phase eine Anhäufung von kleinen Fragmenten mit einer Kettenlänge unter etwa 4 Nukleosomen beobachtet. Nach den vorausgegangenen Studien über die Bindungseigenschaften des Histons H1 war es naheliegend, die Veränderungen in der Löslichkeit des Chromatins mit der Umverteilung von H1-Moleküle von kleinen auf große Chromatinfragmente in Zusammenhang zu bringen. Diese Vorstellung wurde überprüft.

> Es wurden Kerne in 80 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM Tris, pH 7.5, zur Bildung großer Fragmente sehr milde mit Nuklease behandelt (40 u/mg DNS, 30 min bei 0° C, 30 % Ausbeute). Nach Lyse der Kerne durch Ausverdünnen der $CaCl_2$-Konzentration auf 0.5 mM und Abtrennung ungelösten Materials wurde die Chromatinlösung zur Aktivierung der Nuklease auf 37° C erwärmt.

Aus Abb. 17 geht hervor, daß sich die optische Dichte (260 nm) der löslichen Phase nach einer kurzen Verzögerung um etwa die Hälfte verringerte (x - x). Entsprechend nahm die optische Dichte des gleichzeitig präzipitierten Materials zu (o - o). Größenanalysen der DNS des löslichen und unlöslichen Materials zeigen (Abb. 18), daß die löslichen Fragmente sehr viel schneller und weiter abgebaut

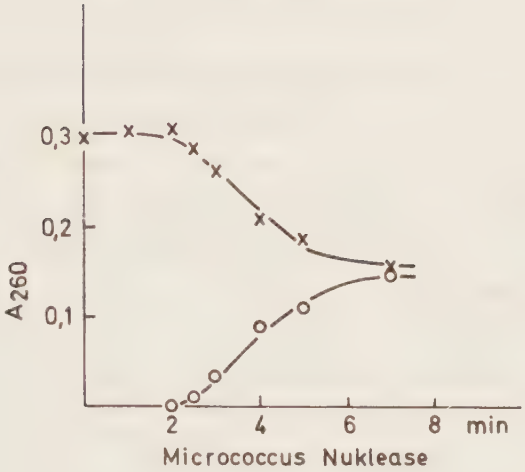

Abb. 17

Die optische Dichte (A_{260}) des Überstandes (x - x) bzw. des präzipitierten Materials (o - o) in Abhängigkeit von der Abbauzeit mit Mikrokokkus Nuklease.

Abb. 18

(DNS-Agarose-Gele)

Analysen der DNS-Fragmentgrößen des Überstandes und des Präzipitats nach verschiedenen Abbauzeiten mit Mikrokokkus Nuklease.

Überstand (a-g): Nach 0 (a), 1 (b), 2 (c), 3 (d), 4 (e), 5 (f) und 7 min (g);

Präzipitat (h-k): Nach 4 (h), 5 (i) und 7 min (k).

wurden als die präzipitierten Fragmente. So wurden nach Ende des Abbaus (7 min) lösliche DNS-Bruchstücke gefunden, die aufgrund ihrer Größe hauptsächlich einzelnen Nukleosomen zugeordnet werden müssen. Die präzipierten Chromatinfragmente hingegen enthalten DNS-Stücke, die ihrer Größe nach mehreren Nukleosomen entsprechen. Simultan durchgeführte Proteinanalysen zeigen, daß mit zunehmender Abbauzeit der H1-Gehalt der löslichen Fragmente relativ stark im Vergleich zu den vier anderen Histonen abnimmt. In Abb. 19 ist nach densitometrischer Ausmessung der Gele das Verhältnis von H1 zu Gesamthiston in Abhängigkeit von der Abbauzeit mit Mikrokokkus Nuklease dargestellt. Aus der Kurve kann man ersehen, daß die stark verkürzten Chromatinfragmente letztlich nur noch etwa 40 % ihres ursprünglichen H1-Gehaltes binden können. Dagegen wurde in den präzipitierten, größeren Fragmenten ein Zuwachs von 30 % an H1 festgestellt (nicht gezeigt). Die Bindung zusätzlicher H1-Moleküle steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Präzipitation dieser Fragmente. Das hier angeführte Experiment ist ein

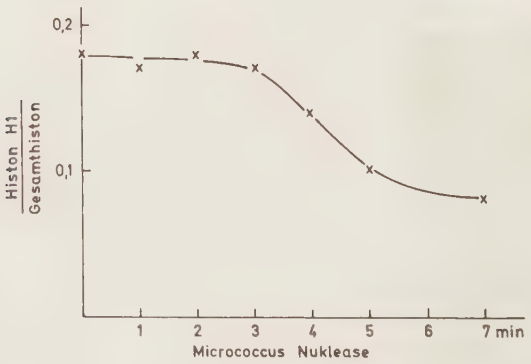

Abb. 19

Relative H1-Gehalt (Verhältnis von H1 zu Gesamthiston) in den Fragmenten des Überstandes in Abhängigkeit von der Abbauzeit mit Mikrokokkus Nuklease.

weiterer Hinweis auf die Bindungspräferenz des H1 an größere Chromatinfragmente in Lösungen mittlerer NaCl-Konzentration. Des weiteren erhält man aus diesem Experiment die Information, daß die Chromatinfasern nicht mit H1 gesättigt sind.

2.3.2. Kompetition großer und kleiner, H1-freier Fragmente um H1 im Filterbindungstest

Die Neigung des Histons H1, bevorzugt an größere Fragmente zu binden, ließ sich in einem weiteren Experiment bestätigen. Das Prinzip des Versuchs bestand darin, daß in einer Testreihe H1-freie Chromatinfragmente mit einer Kettenlänge von drei Nukleosomen (Trisomen) und jeweils gleiche Mengen H1-freier Fragmente variabler Größe um nachträglich zugegebenes H1 kompetierten. Die Trisomen waren mit ^{3}H-Thymidin radioaktiv markiert. Sie waren genügend klein, um frei von H1 Nitrozellulosefilter passieren zu können. Dagegen wurden sie nach Bindung von H1 auf den Filtern zurückgehalten.

Nach Ende der Reaktionszeit - etwa 15 min nach Zugabe von H1 war das System im Gleichgewicht - wurden die verschiedenen Testansätze durch Nitrozellulosemembranen filtriert. Die auf dem Filter verbliebene Radioaktivität wurde bestimmt und als Funktion der Kettenlänge der nichtmarkierten Fragmente aufgezeichnet (Abb. 20).

Die Tests wurden in 40 mM NaCl, 5 mM Tris, pH 7.5, durchgeführt. Eine kooperative Bindung der H1-Moleküle müßte sich, analog zu den zuvor beschriebenen Experimenten, durch die hohe Affinität dieser Histone zu den jeweils größeren der im Test eingesetzten Fragmente nachweisen lassen. In einem Gemisch aus tritiummarkierten Trisomen und nichtmarkierten Mono- oder Dinukleosomen würde man demnach erwarten, daß die H1-Moleküle bevorzugt an die größeren Trisomen binden.

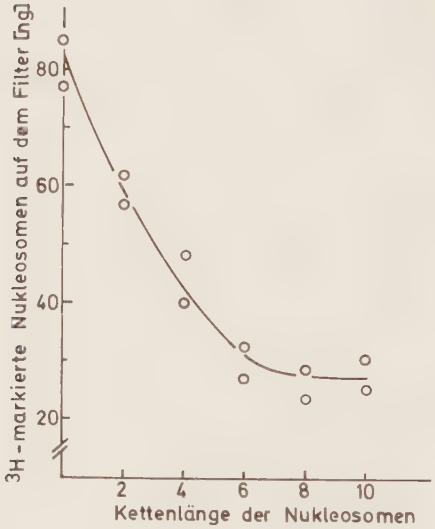

Abb. 20

Filterbindungstest nach Kompetition zwischen jeweils H1-freien ^{3}H-markierten Trisomen und Nukleosomen unterschiedlicher Kettenlänge um H1 (15 % (g/g) bezogen auf DNS). Die Tests wurden in Gegenwart von 40 mM NaCl, 5 mM Tris, 0.2 mM EDTA, pH 7.5, durchgeführt. Die Menge der jeweils gebildeten H1-Trisomenkomplexe ist als Funktion der Größe der um H1 kompetierenden Fragmente aufgezeichnet.

Dem hohen Anteil an Trisomen-H1-Komplexen entsprechend wäre die auf den Nitrozellulosefiltern nachweisbare Radioaktivität hoch. Dagegen würden die H1-Moleküle in einem Gemisch aus (tritiummarkierten) Trisomen und (nichtmarkierten) Fragmenten mit einer Kettenlänge von beispielsweise 6 Nukleosomen (Hexasomen) bevorzugt an die längeren Hexasomen binden. Die Folge wäre, daß ein Großteil der Trisomen frei

von H1 sein würde und die Membranen passieren könnte. Entsprechend niedrig wäre dann die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität.

Aus der Graphik in Abb. 20 geht hervor, daß die Menge an radioaktiven Trisomen auf den Filtern - und damit die Menge an H1-Trisomen-Komplexen - graduell mit der Nukleosomenzahl der im Kompetitionstest eingesetzten Fragmente abnimmt und bei etwa 6 - 8 Nukleosomen ein Plateau erreicht. Der abfallende Teil der Kurve (bis etwa 6 Nukleosomen) verdeutlicht, wie schon in Kapitel 2.2.2. und 2.3.1. gezeigt wurde, daß größere Fragmente besser um H1 kompetieren können als kleinere. Die Stabilität der H1-Fragment-Komplexe nimmt demnach mit der Größe der Nukleosomenkette zu. Der konstante Teil der Kurve ($\sim$ 6 - 10 Nukleosomen) besagt jedoch, daß die Komplexstabilität nur bis zu einer Kettenlänge von etwa 6 - 8 Nukleosomen wächst.

2.4. H1-freies Chromatin

Aus einer Reihe von Arbeiten geht hervor, daß die Nukleosomenstruktur des Chromatins (in EDTA/Wasser) nach Ablösung von H1 erhalten bleibt (OUDET et al., 1975) und, daß die H1-freien Fragmente in NaCl-Lösungen zwischen 20 und 500 mM löslich sind (BRADBURY et al., 1975; LEWIS et al., 1976). Bislang gibt es allerdings keine Hinweise dafür, daß H1-freie Chromatinfasern auch in Lösungen mittlerer NaCl-Konzentrationen (40 - 100 mM) als extendierte Nukleosomenketten vorliegen. Um nachweisen zu können, daß die 200 Å dicken Chromatinfasern nach Abtrennung von H1 zur 85 Å dicken Faser (offene Nukleosomenketten) entfaltet werden, wurde die Struktur der H1-freien Fasern in Lösungen verschiedener NaCl-Konzentrationen elektronenmikroskopisch untersucht. Des weiteren wurde - analog zu den zuvor beschriebenen Sedimentationsexperimenten (Kapitel 2.2.) - das Sedimentationsver-

halten der H1-freien Fragmente in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration untersucht. Schließlich wurden die H1-freien Fasern wieder mit H1 rekombiniert und die daraus resultierende Konformationsänderung der Fasern elektronenmikroskopisch und durch Sedimentationsanalysen charakterisiert.

2.4.1. Sedimentationsverhalten von H1-freien Chromatinfragmenten vor und nach Rekombination mit H1

Zur Ablösung des H1 wurden große Chromatinfragmente (siehe 2.2.3.) bei 40 mM NaCl, 5 mM Tris, 0.2 mM EDTA, pH 7.5, mit tRNS inkubiert (ILYIN et al., 1971). Aufgrund seiner größeren Affinität zu RNS als zu DNS wurde H1 dem Chromatin entzogen. Die Abtrennung der H1-freien Chromatinfragmente von den H1-tRNS-Molekülen erfolgte über eine Sepharose 4B-Säule. Proteinanalysen vor und nach tRNS-Behandlung des Chromatins (Abb. 21) belegen, daß H1 quantitativ abgelöst werden kann. Aliquots der H1-freien Chromatinlösung wurden gegen Lösungen verschiedener NaCl-Konzentrationen (60 und 10 mM NaCl) dialysiert und wie zuvor (2.2.3.) zentrifugiert.

Die Graphik in Abb. 22 zeigt, daß die mittleren Sedimentationskoeffizienten der tRNS-behandelten Fragmente über 35 mM NaCl (□ - □) sehr viel kleiner sind als die der unbehandelten Fragmente (o - o) und sich mit abnehmender NaCl-Konzentration nur wenig ändern.

Nach Zugabe von H1 (13 % (g/g) bezogen auf DNS) nimmt der mittlere Sedimentationskoeffizient der H1-freien Fasern bei 10 mM NaCl

Abb. 21

Chromatinfasern mit (a) und ohne (b) tRNS-Behandlung

nur wenig - entsprechend der Massenzunahme der Fasern - zu. Bei 30 mM NaCl hingegen ändert sich der Sedimentationskoeffizient der rekombinierten Fasern beträchtlich und erreicht fast den Wert der globulären, 200 Å-dicken Faser (siehe große Kreise in Abb. 22).

2.4.2. Struktur von Chromatinfasern vor und nach Rekombination mit H1

Die geringe Änderung im Sedimentationsverhalten der H1-freien Chromatinfragmente zwischen 60 und 10 mM NaCl (siehe Abb.) ließ vermuten, daß die H1-freien Fasern auch bei höheren Salzkonzentrationen als extendierte Nukleosomenketten vorliegen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Abb. 23) bestätigen die Richtigkeit dieser Annahme: Die H1-freien Fasern zeigen bei 0.2 mM EDTA, 40 mM NaCl und 150 mM NaCl (Abb. 23a, c, e) die typische Nukleosomenstruktur, wie sie sonst nur bei H1-haltigen Fasern in niedrigem Salz (Abb. 23f) zu sehen ist. Die unterschiedliche Anordnung der Fasern ist - wie bereits berichtet (Kapitel 2.1.1.) - auf die jeweilige Ionenstärke

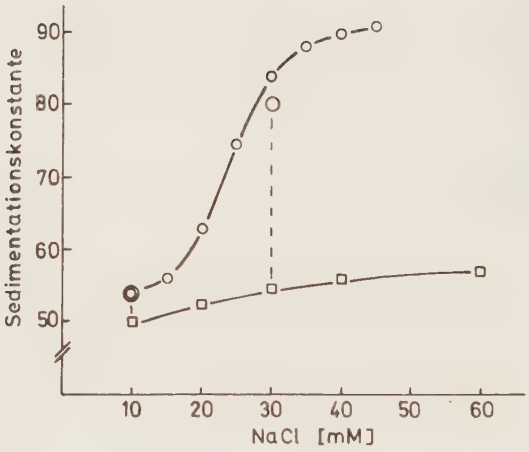

Abb. 22

Sedimentationsverhalten vollständiger Chromatinfragmente (o - o) und H1-freier Fragmente (-) in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration. Die großen Kreise bei 10 und 40 mM NaCl reflektieren die Zunahme des Sedimentationskoeffizienten H1-freier Fragmente nach Rekombination mit H1.

des Präparationspuffers zurückzuführen: Bei sehr niedrigem Salz (0.2 mM EDTA) sind die Fasern stark ausgerichtet, bei 40 mM sind sie gut gespreitet und bei 150 mM neigen die Fasern zu ausgeprägten lateralen Kontakten.

Nach Zugabe von H1 bei 40 mM NaCl nimmt die rekombinierte Faser eine Konformation ein, die der globulären 200 Å-Struktur der vollständigen Chromatinfasern ähnelt (Abb. 23b, d). Eingehende Studien über den Rekonstitutionsmechanismus der 200 Å-Faser konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Offensichtlich ist der Einfluß von NaCl-Ionen nicht zureichend, um aus Nukleosomenketten eine 200 Å-Faser aufzubauen. Vielmehr geht aus den Rekombinationsversuchen hervor (Abb. 22 und 23), daß neben mono- und wahrscheinlich auch divalenten Ionen ausschließlich H1 für die Abfaltung der 85 Å-Faser - und damit für eine weitere Abpackung der DNS - verantwortlich ist.

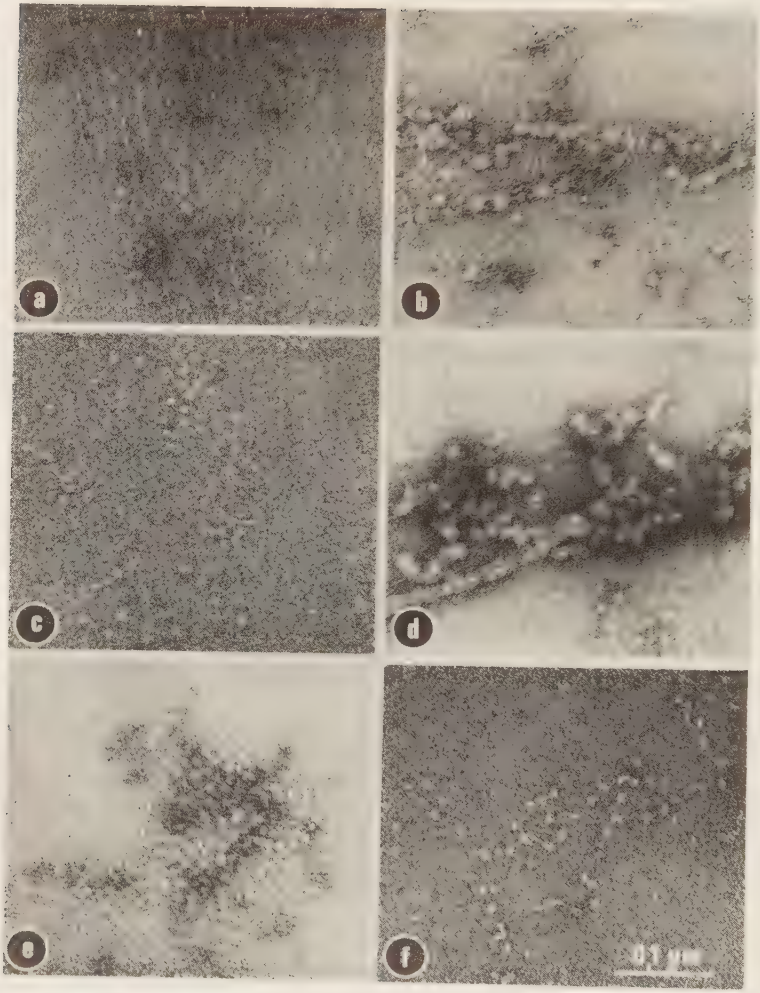

Abb. 23

H1-freie Chromatinfasern bei 0.2 mM EDTA (a), 40 mM NaCl (c) und 150 mM NaCl (e); Abb. f zeigt zum Vergleich eine vollständige Chromatinfaser bei 0 mM NaCl; die Abb. b und d zeigen H1-freie Fasern nach Rekombination mit H1 in Gegenwart von 40 mM NaCl. Alle Präparate sind mit Uranyl-Acetat negativ kontrastiert.
Vergrößerung: 180.000-fach

DISKUSSION

Zur Isolierung löslicher Chromatinfragmente:

Nahezu alle in der Literatur beschriebenen in-vitro-Experimente wurden bislang mit Chromatin durchgeführt, das bei sehr niedrigen und unphysiologischen Ionenstärken (z.B. < 20 mM NaCl) präpariert wurde, weil es unter diesen Bedingungen leicht löslich ist (BONNER et al., 1967; ZUBAY und DOTY, 1959; PAUL und GILMOUR, 1966; BUSCH, 1967). Die Isolierung von Chromatin bei mittleren NaCl-Konzentrationen (etwa 20 - 100 mM) ist schwierig, weil es zur Präzipitation neigt. Eine Möglichkeit, das Ausfallen des Chromatins zu vermeiden, ist die Fragmentierung der in vivo enorm langen Chromatinfasern. Weshalb die Fasern nach ihrer Zerschneidung löslich sind, ist nicht eindeutig zu erklären. Auf eine Diskussion einzelner Denkmöglichkeiten soll hier verzichtet werden.

REES et al. (1974) haben diese Methode eingeführt, wobei die Autoren zur Fragmentierung des Chromatins auf die im Zellkern endogen vorhandenen Nukleasen zurückgriffen. Die dabei erzielten Ausbeuten an löslichem Material liegen allerdings mit etwa 20 - 50 % unter den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Werten (nahezu 100 %). Außerdem können unter den Abbaubedingungen, die nach REES et al. für eine effektive nukleolytische Spaltung der Chromatinfasern Voraussetzung sind (37° C, > 1 h), infolge ebenfalls im Zellkern vorhandener Proteasen Nebenreaktionen auftreten, die sich in einer Degradation vor allem des für die Struktur des Chromatins so wichtigen, protease-sensitiven Histons H1 bemerkbar machen dürften.

Zur Isolierung löslicher Chromatinfragmente wurde in der vorliegenden Arbeit exogen zugegebene Nuklease (Mikrokokkus Nuklease) ver-

wendet. Bemühungen, dasselbe Ziel durch mechanisches Scheren des Kernmaterials zu erreichen, führten zu schweren, elektronenoptisch nachweisbaren Beschädigungen der Faserstruktur. Ähnliche Beobachtungen haben NOLL et al. (1975), DOENECKE und McCARTHY (1976) und NICOLINI et al. (1976) gemacht.

Vorteile der in unserem Labor entwickelten und in Kapitel II, 1.2. ausführlich beschriebenen Prozedur zur Isolierung löslicher Chromatinfragmente sind die folgenden:
Die Fasern des Interphasechromatins können schnell und quantitativ in lösliche Fragmente geschnitten werden; dadurch wird der Einfluß möglicherweise spezifisch wirkender, endogener Nuklease reduziert. Der Abbau kann bei 0^{o} C vorgenommen werden, proteolytische Aktivitäten sind dadurch nachweisbar unterbunden. Die Ausbeute an löslichen Fasern ist hoch, es ist deshalb unwahrscheinlich, daß speziell organisierte DNS-Sequenzen bevorzugt isoliert werden. Die isolierten Fasern können genügend lang gehalten werden, um DNS-Fragmente sogar in der Größe von Strukturgenen enthalten zu können.

Es ist denkbar, daß diese Methode Chromatin zu isolieren auch ein nützliches Werkzeug zum Studium der Genaktivierung, Transkription und Replikation oder zur Isolierung genaktiven Materials ist.

Zur Faserstruktur des Chromatins:

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Studium der Chromatinstruktur zwei EM-Methoden angewandt, die Negativ-Kontrastierung mit Uranyl-Acetat und die Ficoll-Technik[+] nach MOSES und SOLARI (1976).

[+] Informationen über die Ficoll-Technik wurden uns von Herrn Prof. G. Meyer im MPI für Biologie vor ihrer Veröffentlichung zugänglich gemacht.

Die Negativ-Kontrastierung mit Uranylacetat hatte sich als sehr nützliches Instrument zur Darstellung von Nukleinsäure-Protein-Komplexen, wie Viren und Ribosomen, sowie kleiner Proteine wie z.B. des basischen Trypsins (MELLEMA und Van BRUGGEN, 1968) erwiesen. Zudem scheint sich Uranylacetat aufgrund seiner die Struktur der DNS stabilisierenden Eigenschaften (KELLENBERGER, 1963) für eine gute Erhaltung der Chromatinstruktur besonders zu eignen (RIS, 1975; SOLARI, 1974 und 1976).

Diese Technik wurde unter dem Aspekt weiterentwickelt, die bekannte Nukleosomenstruktur des Chromatins, in der es bei niederen Salzkonzentrationen (< 20 mM NaCl) vorliegt, optimal darzustellen. Es zeigte sich, daß das Erscheinungsbild dieser wohldefinierten Struktur von der Haftung der Chromatinfaser am Kohlefilm des EM-Netzchens abhängt. Die Qualität der Haftung kann, wie ausführlich in Kapitel II, 2.1.1. beschrieben ist, durch die Anwesenheit monovalenter Ionen gesteuert werden und steigt mit deren Konzentration. Sofern eine Erhöhung der Salzkonzentration (> 10 mM) unerwünschte Strukturveränderungen der Chromatinfaser induziert hätte, wurden die Fasern vorher bei niederen Salzkonzentrationen (0 - 10 mM NaCl) mit einem Fixierungsmittel, wie z.B. Glutaraldehyd, behandelt. Nach Optimierung der experimentellen Bedingungen kommt, wie in den Abbildungen 6d und e erkennbar ist, der nukleosomale Charakter der 85 Å-Faser zumindest ebensogut zur Geltung wie mit der komplizierteren Zentrifugationstechnik nach O. MILLER (WOODCOCK, 1973; OLINS und OLINS, 1974).

Durch die Anwendung der Negativ-Kontrastierung konnte auf sonst weitverbreitete EM-Techniken zur Darstellung von Chromatinfasern verzichtet werden. So wurde z.B. die Struktur des Chromatins vorwiegend an Dünnschnitten von Kernen (DAVIES, 1968; KAYE, 1969; EVERID und

SMALL, 1970; ZIRKIN und WOLFE, 1972; RIS, 1975 u.a.) und nach Oberflächenspreitungen von Interphasechromatin in Kombination mit der "Kritischen-Punkt-Trocknung" (GALL, 1963, 1966; RIS und CHANDLER, 1963; WOLFE, 1965; GOOD et al., 1966; WOLFE und GRIM, 1967; RIS und KUBAI, 1970; DuPRAW, 1970; STUBBLEFIELD, 1973; RIS, 1975 u.a.) studiert. Diese Methoden sind allerdings mit Nachteilen behaftet, die bislang eine detaillierte Strukturanalyse der nativen Faser nicht zuließen. So kann einerseits mit der Dünnschnittechnik, die bezüglich der Strukturkonservierung den meisten EM-Techniken überlegen ist, mit einiger Sicherheit nur der Durchmesser der Chromatinfaser bestimmt werden. Das willkürliche Schneiden der räumlich angeordneten Fasern erlaubt kaum eine zuverlässige Strukturanalyse in der Längsrichtung der Faserachse (SOLARI, 1974).

Andererseits verändert sich nach LANG (1973), POOLEY et al. (1973), SOLARI (1971 und 1972) und OLINS (1975) die Morphologie der Chromatinfasern durch Dehydratisierung irreversibel, wenn sie auf wäßrigen Oberflächen gespreitet und anschließend mit der "Kritischen-Punkt-Technik (ANDERSON, 1956) getrocknet werden. Bei dieser Methode muß nämlich die wäßrige Phase durch Lösungsmittel ersetzt werden.

Anstelle der "Kritischen-Punkt-Technik" wurden in einigen Fällen Gefrierbruch- und Gefrierätzverfahren (KOEHLER, 1970 und 1972; RIS, 1969; FINCH und KLUG, 1976) ohne insgesamt befriedigende Ergebnisse angewandt.

Da sich die Negativ-Kontrastierung mit Uranylacetat zur Darstellung der Nukleosomenstruktur der 85 Å-Faser bewährt hatte, wurde sie auch zum Studium der Struktur des nächsthöheren Ordnungsgrades, nämlich der 200 Å-Faser angewandt. Voraussetzung dafür ist allerdings, daß die Fasern bei den Salzkonzentrationen, die zur Aufrechterhaltung ihrer

Struktur erforderlich sind, mit Glutaraldehyd fixiert werden. Mit der Fixierung wird erreicht, daß die Struktur der 200 Å-Faser unempfindlich wird gegenüber den bei der EM-Präparation unvermeidlichen Änderungen der Salzkonzentration.

Die Ultrastruktur des Chromatins, das bei mittleren Salzkonzentrationen (40 - 100 mM NaCl) löslich ist, zeigt einen Aufbau aus linear angeordneten, globulären Struktureinheiten. Die globulären Strukturen der Fasern schwanken in ihrer Größe zwischen 180 und 210 Å und liegen so dicht beieinander, daß zwischen ihnen keine Bereiche freier DNS sichtbar sind. Der globuläre Aufbau der 200 Å-Faser ist ebenfalls nach Präparation mit der Ficoll-Technik zu erkennen (Abb. 10a und b). Bilder, die diesen Aufbau demonstrieren, wurden zudem in Zusammenarbeit mit H.-W. ZENTGRAF[+] mit der Zentrifugationstechnik nach O. MILLER erzielt (nicht abgebildet).

Die hier beschriebene Struktur der 200 Å-Faser steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen, die andere Autoren in jüngster Zeit gemacht haben: BRASCH (1976) und FRANKE et al. (1976) fanden in Dünn- und Kalottenschnitten von in situ fixierten Kernen globuläre 200 Å-Strukturen. KIRYANOV et al. (1976) untersuchten mit der Dünnschnitttechnik die Struktur isolierter Fasern (aus Rattenleber), die nach kontrollierter Autolyse mit endogenen Nukleasen in Gegenwart mono- und divalenter Ionen löslich waren. Sie berichten: "Jede Faser besteht aus einer Reihe globulärer Partikel, die dicht nebeneinander liegen" und "die globulären Partikel haben einen mittleren Durchmesser von 200 - 250 Å".

Neben den EM-Bildern sprechen für die Gliederung der 200 Å-Chromatinfaser in globuläre Untereinheiten weitere Befunde der vorliegenden

---

[+]Deutsches Krebsforschungszentrum in Heidelberg

Arbeit: Beim Einwirken von Mikrokokkus Nuklease auf Interphasekerne werden Chromatinfasern nicht stufenlos bis zu einzelnen Nukleosomen abgebaut, vielmehr werden zunächst Zwischenprodukte mit einem mittleren Sedimentationskoeffizienten von etwa 50 S angereichert. Sie sind isolierbar und im EM als distinkte, globuläre Partikel zu erkennen. Aus den EM-Bildern kann abgeschätzt werden, daß sich diese Partikel aus etwa 6 - 10 Nukleosomen zusammensetzen (HOZIER, RENZ, NEHLS, 1977). Weitere, im Zusammenhang mit Histon H1 stehende Eigenschaften dieser Strukturen werden im nachfolgenden Kapitel der Diskussion behandelt.

Mit den bisher vorgestellten Befunden wird ein Prinzip eines diskontinuierlichen Aufbaus der 200 Å-Faser manifest. Im Gegensatz dazu steht eine Modellstudie von CRICK (1976), die einen kontinuierlichen Aufbau der Faser fordert. CRICK postuliert eine superhelikale Aufwindung der 85 Å-Faser zu einem Solenoid[+] mit einem Durchmesser von 300 Å. Er bezieht sich dabei auf Röntgenstrahlreflektionen bei 110 Å und ordnet diesen Wert der Höhe zu, die die 85 Å-Faser bei einem Umlauf gewinnt. Ein Umlauf würde einem Faserabschnitt von 6 Nukleosomen entsprechen.

FINCH und KLUG (1976) ergänzten die Überlegungen CRICKS mit elektronenmikroskopischen Studien an Chromatinfragmenten, die bei niedrigen Ionenstärken (0.2 mM EDTA) die übliche nukleosomale Struktur einnehmen und sich nach Zugabe von 0.5 mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) zu solenoid-ähnlichen Gebilden umstrukturierten.

Das von FINCH und KLUG beschriebene Chromatin unterscheidet sich erheblich von der Struktur, die wir im EM beobachtet haben (Kapitel

---

[+]Im englischen häufig gebrauchter Ausdruck; im deutschen nach DORIAN und BROCKHAUS: Zylinderspule.

2.1.2.). Wir haben geprüft, ob die diskontinuierliche Struktur der löslichen 200 Å-Fasern möglicherweise Solenoide darstellt, die durch die Nukleasebehandlung oder die von uns angewandten EM-Techniken die Regelmäßigkeit ihrer Aufwindung verloren haben. Gegen eine mit Nuklease induzierte Umstrukturierung spricht allerdings, daß nichtfragmentierte Fasern nach Oberflächenspreitung oder Fixierung mit Glutaraldehyd in situ (siehe II, 2.1.3.) dieselbe Morphologie aufweisen wie enzymatisch gewonnene Chromatinfragmente. Um auszuschließen, daß die Struktur der Fasern während der EM-Präparation verändert wird, wurden darüber hinaus folgende Experimente durchgeführt (HOZIER, RENZ, NEHLS, 1977): Aliquots von Chromatinlösungen mit einer NaCl-Konzentration von 70 mM wurden 1.) mit $MgCl_2$ (0.5 mM) versetzt oder 2.) gegen 0.2 mM EDTA dialysiert und anschließend wieder mit 0.5 mM $MgCl_2$ versetzt, wie es FINCH und KLUG getan haben. Danach wurden alle Faserpräparate nach der Negativkontrast-Technik weiterverarbeitet. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben, daß die diskontinuierliche globuläre Struktur der Fasern auch nach Zusatz von Mg-Ionen erhalten blieb. Wurden jedoch die Chromatinlösungen zuerst gegen 0.2 mM EDTA dialysiert und anschließend wieder mit Magnesiumchlorid versetzt, nahmen die Fasern Strukturen an, wie sie von FINCH und KLUG beschrieben wurden. Dieselbe Struktur wurde beobachtet, wenn statt Magnesium-Natriumchlorid verwendet wurde. Da die superhelikale Faserstruktur, sofern sie vorliegt, auch mit der EM-Technik, wie sie in unserem Labor praktiziert wird, dargestellt werden kann, ist es unwahrscheinlich, daß die globuläre 200 Å-Struktur ein präparationsbedingter Artefakt unserer EM-Technik ist. Vielmehr ist anzunehmen, daß die verschiedenen Arten, die 200 Å-Faser zu präparieren, zu den beobachteten unterschiedlichen Chromatinstrukturen führt.

Offen bleibt allerdings die Frage, ob die Nukleosomenketten inner-

halb der von uns dargestellten, globulären Struktur im Sinne von CRICK spiralig aufgewunden sein können. Eine Antwort darauf könnte eventuell mit Röntgen- und Neutronenbeugungs-Studien gegeben werden. Untersuchungen dieser Art werden derzeit zusammen mit einer Arbeitsgruppe von E.M. BRADBURY durchgeführt.

Zur Rolle des H1 beim Aufbau des Chromatins:

Zur Abfaltung der Nukleosomenketten in die 200 Å-Faser müssen zwei Bedingungen erfüllt sein: Erstens ist die Anwesenheit von Histon H1 erforderlich, und zweitens muß ein Salzbereich von 40 bis etwa 100 mM NaCl eingehalten werden. (Wir haben Hinweise dafür, daß Chromatin in Salzkonzentrationen über etwa 120 mM NaCl weiter abgepackt wird.)

Die Rolle des Histons H1 als Packungsprotein des Chromatins ist bereits seit längerem bekannt (OHLENBUSCH et al., 1967). Publikationen, die in neuerer Zeit erschienen sind (KORNBERG und THOMAS, 1974; THOMAS und KORNBERG, 1975; OUDET et al., 1975), weisen darauf hin, daß seine Funktion bei einer Chromatinfaltung höherer Ordnung erwartet werden darf, da es zum Aufbau der Nukleosomen nicht erforderlich ist. In der vorliegenden Arbeit werden Experimente vorgestellt (Kapitel II, 3.1.1. und II, 3.1.2.), aus denen hervorgeht, daß Histon H1 für den Aufbau der 200 Å-Faser essentiell ist: Unter Salzbedingungen, bei denen die 200 Å-Faser gewöhnlich stabil bleibt (> 40 mM NaCl), führt die schonende und vollständige Entfernung von H1 zum Zerfall der Struktur in eine extendierte Nukleosomenkette. Umgekehrt wird demonstriert, daß die H1-freien Nukleosomenketten nach Zugabe von H1 wieder zu einer Überstruktur aufgefaltet werden.

Neben der oben erwähnten Bedingung, daß Histon H1 zum Aufbau der 200 Å-Fibrille benötigt wird, muß eine weitere Voraussetzung zur Er-

haltung dieser Struktur, nämlich das Vorhandensein bestimmter Salzkonzentrationen, erfüllt sein. Dieses wird in folgenden Experimenten deutlich. Wenn die Struktur des Chromatins im EM in Abhängigkeit der Salzkonzentration beobachtet wird, kann man feststellen, daß Chromatinfasern zwischen 40 und etwa 100 mM NaCl in der kondensierten, 200 Å dicken Faserkonformation vorliegen (II, 1.2. und 1.3.) und mit abnehmender Salzkonzentration über einen engen Bereich zwischen 40 und 15 mM NaCl zu extendierten Nukleosomenketten (100 Å) entfaltet werden (siehe Abb. 16). Die Entfaltung der Fasern läßt sich zudem in einer drastischen Abnahme ihrer Sedimentationskoeffizienten im nämlichen Salzbereich nachweisen (siehe Abb. 15).

Ein ähnlicher steiler Abfall im Sedimentationsverhalten, wie er beim Zerfall der 200 Å-Faser in die 85 Å-Faser beobachtet wurde, und der nahezu exakt im selben Salzbereich verläuft (20 - 30 mM NaCl), wurde schon früher von RENZ und DAY (1976) beim Studium der Bindung von H1 an DNS in Abhängigkeit von der Salzkonzentration beschrieben. Die Autoren interpretieren diese drastische Abnahme der Sedimentationskonstanten von DNS-H1-Komplexen als Folge eines Übergangs von kooperativer zu nichtkooperativer Bindung der H1-Moleküle an DNS.

Sofern H1 nicht nur an DNS sondern auch an Nukleosomenketten kooperativ binden kann, worauf die in einem definierten, engen Salzbereich ablaufende Entfaltung der 200 Å-Faser bereits hindeutet, würde man nach RENZ und DAY erwarten können, daß H1 eine Bindungspräferenz zu großen Chromatinfragmenten aufweist. Für den Fall einer nichtkooperativen Bindung müßte eine Verteilung der H1-Moleküle auf Fragmente aller Größen nachweisbar sein.

Zum Nachweis einer kooperativen Interaktion zwischen H1 und Nukleosomenketten wurden zwei Experimente durchgeführt, die eine quantita-

tive Aussage über die Affinität der H1-Moleküle zu Chromatinfragmenten unterschiedlicher Größe erlauben (II, 2.2.2. und 2.3.2.). Demnach wächst die Affinität mit der Kettenlänge der Fragmente und erreicht bei 6 - 10 Nukleosomen das Maximum. In einem weiteren Experiment, bei dem Chromatin mit Mikrokokkus Nuklease stark abgebaut wurde, kann die Bindungspräferenz sogar zu einer Überladung der größeren Fragmente mit H1 und damit zu deren Präzipitation führen.

Alle oben erwähnten Experimente wurden bei mittleren Salzkonzentrationen (40 - 80 mM NaCl) ausgeführt, also unter Bedingungen, bei denen die Chromatinfasern die kondensierte, 200 Å-Struktur einnehmen. In Lösungen niederer Salzkonzentrationen (< 20 mM NaCl), die für die Darstellung der extendierten Chromatinfaser (85 Å) Voraussetzung sind, ist nach RENZ und DAY zu erwarten, daß H1 nichtkooperativ an Nukleosomen gebunden ist. In einem entsprechenden Experiment wird gezeigt, daß dies der Fall ist (II, 2.2.2.2.): Die Bindungspräferenz der H1-Moleküle ist aufgehoben; sie sind auf alle Chromatinfragmente verteilt.

Die Nukleosomenketten (6 - 10 Nukleosomen), zu denen kooperativ gebundenes H1 eine maximale Affinität hat (II, 2.3.2.), decken sich in ihrer Länge erfreulich gut mit den Größen der Fragmente (6 - 8 Nukleosomen), die Histonanalysen zufolge den vollen Besatz an Histon H1 haben. Es ist wahrscheinlich, daß die globulären Partikel, die als weniger nuklease-sensitive Zwischenprodukte Sedimentationskonstanten zwischen 40 und 50 S haben (II, 1.2.), aus Faserabschnitten aufgebaut sind, die eben dieser Länge von 6 - 10 Nukleosomen entsprechen. Die zuvor genannten, sowie die im EM-Teil der Diskussion behandelten Befunde tragen zu unserer Überzeugung bei, daß sich die 200 Å-Faser aus globulären Strukturen zusammensetzt, die durch Abfal-

tung von jeweils 6 - 10 Nukleosomen nach kooperativer Bindung von H1 entstanden sind.

Über die Bindungsstellen der H1-Moleküle innerhalb des Chromatins - vor allem unter kooperativen Bedingungen - ist bislang wenig bekannt. Eine einfache Denkmöglichkeit ist, daß die im mittleren Teil der H1-Moleküle liegenden stark hydrophoben Bereiche miteinander interagieren (BRADBURY, 1975). Die zwanglose Folgerung daraus wäre, daß mehrere H1-Moleküle auf diese Weise zu einem Komplex zusammengefaßt werden würden, aus dem die stark basischen, C-terminalen Hälften dieser Histone herausschauen würden. Als Bindungsort für die polaren Histonreste wäre dann aus elektrostatischen Gründen die DNS anzusehen. Sofern diese Hypothese stimmt, bieten sich für eine H1-DNS-Interaktion zwei Modelle an: 1.) Die C-terminalen Histonhälften sind jeweils an die internukleosomalen DNS-Bereiche gebunden; 2.) die C-terminalen Histonhälften verbinden blockweise zusammengefaßt speziell organisierte, distinkt vorkommende DNS-Sequenzen miteinander und falten dazwischen liegende, mit Nukleosomen besetzte DNS-Bereiche schleifenförmig ab. Als Hinweis für die zuerst genannte Theorie werden gerne VARSHAVSKY et al. (1976) zitiert, die mononukleosomale "Core"-Partikel (140 BP) mit und ohne internukleosomalen DNS-Stücken (∿ 60 BP) isolierten und experimentell belegen konnten, daß nur Nukleosomen mit internukleosomaler DNS H1-Moleküle gebunden hatten. Nach den Experimenten zu urteilen, die der hier vorliegenden Arbeit zugrundeliegen, ist dieser Hinweis nicht zwingend, da die Experimente VARSHAVSKY's bei niedrigen Ionenstärken durchgeführt wurden, also unter Bedingungen, bei denen H1 nichtkooperativ gebunden ist.

Für die alternativ angeführte Modellvorstellung könnte sprechen, daß H1 unter kooperativen Bindungsbedingungen bevorzugt an AT-reiche DNS-Sequenzen bindet (EVENSON et al., 1972; SPONAR und SORMOVA, 1972;

RENZ und DAY, 1976). In Erweiterung dieses Befundes wäre es auch vorstellbar, daß die H1-Moleküle in vivo bevorzugt an mittelrepetitive DNS-Sequenzen binden, die (etwa 300 BP lang) sich alternierend mit "Unique"-Sequenzen der DNS (unterschiedlich groß, im mittel 150 BP ≙ 7 - 8 Nukleosomen) abwechseln (DAVIDSON et al., 1973). Mit dieser unbewiesenen Theorie könnte jedenfalls die unterschiedliche Partikelgröße innerhalb der 200 Å-Faser erklärt werden.

Experimente, die zur Zeit mit spezifisch gegen H1 gerichteten Antikörpern und mit im Chromatin speziell vernetzten H1-Molekülen durchgeführt werden, können möglicherweise dazu beitragen, die Bindungsorte des H1 zu charakterisieren und damit das eine oder andere Modell zu bestätigen.

MATERIAL UND METHODEN

1. Präparation von Zellkernen aus Kalbslymphozyten

Lymphknoten (Lymphonodi retropharyngeales mediales et bifurcales) frisch geschlachteter Kälber wurden von anhaftendem Gewebe und Blut befreit, mit einer Schere zerkleinert und durch eine Knoblauchpresse gedrückt. Das passierte Zellmaterial wurde nach TENG et al. (1971) in 5 Volumina 0.32 M Sucrose, 3 mM $MgCl_2$ aufgenommen, 5 - 10 sec in einem Waring Blender (kleine Stufe) homogenisiert und durch 8 Schichten Verbandsmull filtriert. Das Filtrat wurde 10 min bei 1200 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 5 Volumina 0.32 M Sucrose, 3 mM $MgCl_2$ aufgenommen, zum Aufschluß der Zellen in einem Teflonhomogenisator (Braun, Melsungen) bei 1500 rpm (15 - 20 "strokes") homogenisiert und 10 min bei 1200 x g zentrifugiert.

Zur weiteren Reinigung der Kerne wurde das Sediment nach BLOBEL und POTTER (1966) in 5 Volumina 0.25 M Sucrose, 3 mM $MgCl_2$, 0.5 % Triton X-100 resuspendiert (Glashomogenisator, L-Stempel), im Zentrifugenbecher mit 1/4 - 1/3 Volumen 0.32 M Sucrose, 3 mM $MgCl_2$ unterschichtet und 10 min bei 1200 x g zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde 2 - 3mal wiederholt, bis das Kernpellet farblos war. (Alle Schritte bei 0 - 4° C).

Die Kerne wurden bis zu ihrer Verwendung in 66 % Glyzerin, 1 mM $MgCl_2$ bei -70° C aufbewahrt.

2. Präparation von Chromatin nach DNS-Abbau mit Nuklease in situ

Abbau-Puffer (Puffer D):

1 mM	$CaCl_2$
0.25 M	Sucrose
5 mM	Tris (pH 7.5) oder TEA (pH 7.2)

Stop-Puffer "STE" (hohe Ionenstärke, 2fache Konzentration:

0.08 - 0.2 M	NaCl
5 mM	EDTA
5 mM	Tris (pH 7.5) oder TEA (pH 7.2)

Stop-Puffer "TE" (niedrige Ionenstärke), 2fache Konzentration:

5 mM	EDTA
5 mM	Tris (pH 7.5) oder TEA (pH 7.2)

Kernsuspensionen ($1.7 - 2.5 \times 10^8$ Kerne $\hat{=}$ 1 - 1.5 mg DNS) in 1 ml Abbau-Puffer (D) wurden bei 0° C mit 350 - 500 µ Mikrokokkus Nuklease/mg DNS (Worthington, NFCP) verschiedene Zeiten zwischen 1 - 20 min behandelt. Zur Lyse der Kerne wurde dasselbe Volumen Stop-Puffer "STE" oder "TE" vorsichtig zugemischt. Membranfragmente und unlösliches Chromatin wurden 5 min bei 2000 x g (SS-34 Rotor, Sorvall) abzentrifugiert. Der Überstand der Chromatin-Lösung in "TE"-Puffer wurde in manchen Fällen gegen 0.5 mM Phosphat, 0.2 mM EDTA, pH 6.88, oder 0.2 mM EDTA, pH 7.5, weiterdialysiert.

Die Konzentration des Chromatins im Überstand wurde in einem Zeiss-Spektralphotometer bei 260 nm bestimmt, wobei - unter Vernachlässigung des geringen RNA-Gehaltes in Lymphozytenkernen - für eine optische Dichte von 20 o.d. eine Menge von 1 mg DNA bzw. 1 mg Histon im Chromatin angenommen wurde.

Genaue Abbauzeit und Ionenstärke des Stop-Puffers werden im Zusammenhang mit den jeweiligen Experimenten gesondert angegeben.

3. Abbau großer Chromatinfragmente zu kurzen Nukleosomenketten

Zur Isolierung großer Chromatinfragmente wurden Zellkerne (≙ 20 mg DNS) in 80 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 5 mM Tris, pH 7.5, mit 40 µ Mikrokokkus Nuklease (Boehringer) pro mg DNS bei 0° C inkubiert. Nach 30 min wurden die Kerne durch vorsichtiges Zumischen desselben Volumens 80 mM NaCl, 5 mM Tris (Ausverdünnung der $CaCl_2$-Konzentration auf 0.5 mM) lysiert. Ungelöstes Material wurde 5 min bei 2000 x g (SS-34 Rotor, Sorvall-Zentrifuge) abzentrifugiert.

Die unter limitierten (0° C) Abbaubedingungen gewonnene Chromatinlösung (30 % Ausbeute) wurde für einen aktivierten Weiterabbau der Fragmente auf 37° C (Wasserbad) erwärmt. Nach verschiedenen Zeiten wurden jeweils 1 ml Proben der Lösung entnommen, und die Reaktion mit 40 µl 50 mM EDTA, pH 8.0, (2 mM Endkonz.) gestoppt. Anschließend wurden die Proben in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände wurden die Sedimente in jeweils 1 ml 2 mM Tris, 0.2 mM EDTA, pH 7.5, gelöst. Alle Lösungen wurden photometrisch (Zeiss, 260 nm) auf ihren Chromatingehalt untersucht und anschließend zu DNS- und Histonanalysen weiterverarbeitet.

4. Präparation von ^{3}H-Thymidin-markiertem Lymphozytenchromatin

Von Kalbslymphoknoten wurde die äußere Bindegewebskapsel steril entfernt, das freigesetzte lymphoide Gewebe zerstückelt und durch eine Knoblauchpresse in 50 ml Eagle's Medium + 10 % Kalbserum

passiert. Die Zellsuspension wurde auf 1 - 5 x 10^{10} Zellen in 250 ml Medium eingestellt und zur Entfernung von Zellfragmenten und toten oder nichtlymphoiden Zellen über eine Glaswolle-Säule gereinigt (HAUSEN, STEIN und PETERS, 1963; RABINOWITZ, 1964). Die Lymphozyten wurden danach 20 min bei 1200 x g sedimentiert, 2mal mit Eagle's Medium + 10 % Kalbserum gewaschen, in diesem Medium resuspendiert und in 250 ml Portionen (5 x 10^6 Zellen/ml) auf 750 ml Kulturflaschen verteilt.

Die Zellen wurden mit Phytohämagglutinin P (Difco) (0.25 ml/250 ml Zellsuspension) stimuliert und bei 37° C unter einem CO_2-Luft-Gemisch (5 % : 95 %) inkubiert. Nach 24 h wurden die Kulturen mit ^{3}H-Thymidin angeimpft und weitere 64 h inkubiert.

Danach wurden die Zellsuspensionen 15 min bei 1000 x g zentrifugiert und die sedimentierten Zellen zweimal mit 0.15 M NaCl, 0.01 M Tris, pH 7.5, gewaschen. Aus den Zellen wurden, wie bereits beschrieben, Kerne isoliert.

5. Histon H1-Abtrennung von Chromatin
(modifiziert nach ILYIN et al., 1971)

Eine Kernsuspension wurde wie unter Kapitel 2 beschrieben 4 min bei 0° C mit 350 µ Mikrokokkus Nuklease/mg DNS behandelt, mit demselben Volumen STE-Puffer (40 mM NaCl-Endkonz.) versetzt und zentrifugiert. Zu dem Überstand wurde das gleiche Volumen STE-Puffer (40 mM NaCl), in dem die 20fache Menge tRNS (E.coli, Boehringer) - bezogen auf die DNS der Chromatinlösung - gelöst war, zugegeben. Die klare Lösung wurde etwa 20 min bei 0° C stehengelassen. Anschließend wurde das Chromatin-tRNS-Gemisch über eine Sepharose 4B-Säule durch Elution mit 40 mM NaCl, 5 mM Tris, 0.2 mM EDTA,

pH 7.5, aufgetrennt. Die im Ausschlußpeak eluierten H1-freien Chromatinfragmente wurden gesammelt.

6. Isolierung von Histon H1
(modifiziert nach DeNOOIJ und WESTENBRINK, 1962)

Das Kernsediment wurde nach MARUSHIGE und BONNER (1966) in 50 Volumina 75 mM NaCl, 24 mM EDTA, pH 8.0, resuspendiert und 10 min bei 5000 x g abzentrifugiert. Zur Lyse wurden die Kerne in 50 Volumina 10 mM Tris, pH 8.0, im Glashomogenisator (L-Stempel) resuspendiert und das Chromatin 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt.

Das gelartige Pellet wurde in 10 mM Tris, pH 8.0, aufgenommen, im Virtis 30 sec bei 50 000 rpm geschert und tropfenweise unter Rühren mit 20 %iger Trichloressigsäure (TCA) oder Perchlorsäure (PCA) bis zu einer Endkonzentration von 5 % versetzt. Die milchige Lösung wurde 10 min weitergerührt und anschließend 10 min bei 12 000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 % TCA- oder PCA-Lösung nachgewaschen.

Die Überstände wurden vereinigt und zur Abtrennung nichtsedimentierter Partikel durch eine G1-Glasfritte filtriert. Das Filtrat wurde gegen bidest. Wasser ausgiebig dialysiert und anschließend lyophilisiert. Alle Schritte wurden bei 0 - 4° C durchgeführt.

7. Rekombination von H1-freiem Chromatin mit H1

H1-freie Chromatinlösungen (0.1 - 0.2 mg DNS/ml) in Lösungen niedriger bzw. mittlerer NaCl-Konzentrationen wurden mit 20 % H1 (g/g, bezogen auf DNS) im selben Puffer versetzt und etwa 20 min auf Eis stehengelassen.

8. Sedimentationsanalysen der Chromatinfragmente

Aliquots (0.1 - 0.2 mg DNS/0.5 ml) von Chromatinlösungen in verschiedenen NaCl-Konzentrationen oder von verschieden lang abgebauten Chromatinlösungen bei 80 mM NaCl wurden über lineare 10 - 30 %ige Sucrosegradienten (gleiches Puffersystem wie die Probe) zwischen 2.5 und 4.5 h bei 39.000 rpm in einem SW40-Rotor (Beckman, Spinco-Zentrifuge) zentrifugiert. Die Gradienten wurden in 0.6 ml Portionen über einen Fraktionator (Model 640, ISCO) geerntet, wobei die Chromatinkonzentration über eine optische Einheit (Type 6, ISCO) kontinuierlich bei 256 nm bestimmt und über einen Schreiber (Model UA-5, ISCO) aufgezeichnet wurde. Zur Bestimmung der $S^{o}_{20,w}$-Werte der Chromatinfragmente wurde in jedem Rotor ein Gradient mit einem 28 S rRNS-Marker (von Chr. DREYER, in unserem Institut) parallel mitzentrifugiert.

9. Filterbindungstest

Der Filterbindungstest wurde wie von RENZ und DAY (1976) beschrieben ausgeführt. 150 ng H1-freie ^{3}H-Thymidin-markierte Trisomen und 150 ng H1-freie Fragmente jeweils unterschiedlicher Kettenlänge wurden in 0.5 ml 40 mM NaCl, 5 mM Tris, 0.2 mM EDTA, pH 7.5, zusammen mit 40 ng Histon H1 bei 0^{o} C inkubiert. Die Isolierung der radioaktiv markierten Trisomen und der verschieden großen Fragmente erfolgte durch Auftrennung von H1-freien Chromatinlösungen über Sucrosegradienten und anschließender Fraktionierung (siehe Kapitel 3, 4 und 7). Die Kettenlänge der Fragmente in den jeweiligen Fraktionen wurde über deren DNS-Länge nach Agarose-Gel-Elektrophorese bestimmt.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde das Reaktionsgemisch durch Nitrozellulosefilter filtriert. Die Filter wurden mit demselben Puffer nachgewaschen, getrocknet und auf ihre jeweilige Radioaktivität untersucht. Die Filterretention lag für die ^{3}H-markierten Trisomen in Abwesenheit von H1 (O-Wert) bei etwa 20 %.

10. Elektronenmikroskopie

10.1. Kohlebefilmte Trägernetze (Grids)

Als Objektträger für elektronenoptische Studien am Chromatin wurden Kohlefilme gewählt, da diese sich durch eine hohe Stabilität im Elektronenstrahl und eine hohe elektrische Leitfähigkeit auszeichnen. Diese Eigenschaften erlaubten es, bei hohen Vergrößerungen zu arbeiten, bzw. elektrostatische Aufladungen - wie sie bei plastischen Filmen (Kollodium, Parlodion, Formvar, Pioloform) gelegentlich vorkommen - vermeiden zu können. Ein weiterer Vorteil der Kohlefilme ist, daß sie mit einer geringen Schichtdicke von 20 - 30 Å hergestellt werden können, was für eine gute Strukturauflösung und Arbeiten mit kontrastarmen Objekten Voraussetzung ist.

Zur Präparation von Kohlefilmen wurde eine von KLEINSCHMIDT entwickelte Technik angewandt, die darauf basiert, daß Trägernetze mit einem möglichst ebenen Zwischenträger befilmt werden, der nach dem Aufdampfen der spröden Kohleschicht leicht entfernt werden kann. Die zum Teil modifizierte und der apparativen Ausstattung des Labors angepaßte Methode wird nachfolgend beschrieben.

In einen mit bidest. Wasser gefüllten Trog (85 x 60 x 50 mm) wurde eine Plattform eingetaucht, die im wesentlichen aus einem

rechteckigen Metallrahmen (35 x 25 mm) bestand, über den zuvor Filterpapier gespannt worden war. Das Filterpapier diente als Auflage für etwa 20 Kupfergrids (mesh 400), die mit einer entfetteten Pinzette lose verteilt aufgebracht wurden.

Der Trog wurde mit bidest. Wasser so weit aufgefüllt, daß es mit stark konvexem Meniscus etwa 2 mm über dem Niveau der Trogränder stand, anschließend wurde die Wasseroberfläche mit einem gereinigten Teflonstab mehrere Male abgestreift, um für die nachfolgende Spreitung eine geeignete Oberflächenspannung (schwach konvexer Meniscus) und zusätzlich eine fett- und staubfreie Phasenoberfläche des Wassers zu erhalten. In das Zentrum der Wasseroberfläche wurde ein Tropfen (etwa 50 - 100 µl einer 3.5 %igen Kollodium-n-Amylacetat-Lösung (g/v) pipettiert, der sich radialsymmetrisch ausbreiten und dabei eine dünne, gleichmäßige Schicht bilden sollte. Für die nächsten 4 - 5 min wurde der Trog mit einer Glasschale abgedeckt (ca. 3 cm Abstand zur Spreitoberfläche), um das organische Lösungsmittel möglichst kontrolliert verdampfen lassen zu können. Sobald an den Rändern der gespreiteten Kollodium-Lösung der Trocknungsprozeß (Lichtbrechung und Faltenbildung) eingesetzt hatte, wurde die Plattform mit Hilfe einer Hebevorrichtung vorsichtig aus dem Wasser gehoben und zwar so, daß der Kollodiumfilm alle Kupfernetze bedeckte. Danach wurde das Filterpapier mit den daraufliegenden befilmten Grids aus dem Metallrahmen genommen und etwa 3 h zum Trocknen staubfrei aufbewahrt.

Die Beschichtung der kollodiumbefilmten Trägernetze mit Kohle wurde in einer Gefrierätzanlage von Balzers (BA 500) durchgeführt. In einem Abstand von 12 cm und einem Winkel von 90° zu den Grids wurde ein Verdampferkopf (Balzers EK 552) mit eingesetztem Kohlestab (Ø 3 mm) montiert. Nachdem ein Arbeitsvakuum von $< 5 \times 10^{-6}$ Torr

angelegt war, wurde die Kohle über eine Verdampfungseinheit (Balzers EVM 052) bei einer Beschleunigungsspannung von 1900 V (Vorgabe 2450 V) und einem Emissionsstrom von 90 mA abgedampft. Für Kohleschichten von 20 - 30 Å Dicke wurde 2 - 3 sec bedampft. Anschließend wurde der Kollodiumfilm (nitrierte Zellulose) durch Erhitzen bei 180° C verpufft.

Die kohlebefilmten Trägernetze wurden in Petri-Schalen auf Filterpapier aufbewahrt und konnten so längere Zeit gelagert werden.

10.2. Präparation hydrophiler Kohleoberflächen

Die Kohlefilme haben im allgemeinen stark hydrophobe Eigenschaften, die wahrscheinlich durch Kontamination mit geringen Ölspuren im Hochvakuum (Ölpumpe) verursacht werden. Um die Benetzbarkeit der Trägerfilme für wäßrige Lösungen zu verbessern, wurden zwei Methoden angewandt:

- die Kohleschicht wurde mit einem Albuminfilm überzogen,
- die Kohleoberfläche wurde einer Glimmentladung ausgesetzt.

10.2.1. Albumin-Beschichtung von kohlebefilmten Trägernetzchen

Nach McLEAN und SINGER (1971) wurden kohlebeschichtete Trägernetze auf Tropfen einer 5 %igen Albumin-Lösung (BSA, Behring) in 0.1 M NaCl, 0.05 Natriumphosphat, 0.01 M Glyzin (pH 7.5) inkubiert. Nach 5 min wurden die Grids mit einer Pinzette abgenommen und die überschüssige Albumin-Lösung mit Filterpapier abgezogen. Anschliessend wurde mit vier Tropfen bidest. Wasser, 0.0002 M EDTA-Lösung (pH 7.5) oder 0.005 M Tris-Puffer (pH 7.5) gewaschen. Die Objektträger wurden sofort - ohne getrocknet zu werden - zur Präparation

biologischen Materials weiterverwendet.

10.2.2. Glimmentladung (glow discharge)

Zur Ionisierung der Kohleoberfläche wurden die Trägernetze in einer Edwards-Anlage zwischen zwei Elektroden deponiert. Nach Anlegen eines Vakuums von 0.1 Torr wurde bei einer Spannung von 3000 V und einer Stromstärke von 0.4 A für 8 - 10 min eine Glimmentladung erzeugt.

Die Grids wurden innerhalb der nächsten 30 min weiterverwendet.

10.3. Präparationstechniken

10.3.1. Aufbringen des Materials auf die Objektträger

10.3.1.1. Aus Suspensionen oder Lösungen

Tropfen (50 - 100 µl) von fixierten oder unfixierten Chromatinlösungen (1 - 30 µg DNS/ml) wurden auf Parafilm oder Wachsplatten pipettiert. Auf die Tropfen wurden frisch beglimmte Kohle- oder Albumin-Grids gelegt und je nach Chromatinkonzentration 1 - 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger abgenommen und die überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier abgezogen. Bevor die Grids weiterbehandelt wurden, wurden deren Oberflächen zur Entfernung von Phosphat, NaCl usw. mit 1 - 4 Tropfen bidest. Wasser, 0.0002 M EDTA (pH 7.5) oder isotonen Ammoniumacetat-Lösungen für je 5 - 10 sec gewaschen.

10.3.1.2. Spreitung von Kernen
(nach GALL, 1966)

Mit einem kleinen Spatel wurde eine geringe Menge einer Kernsuspension in 66 % Glyzerin, 1 mM $MgCl_2$ entnommen und auf die Oberfläche (ca. 5 cm^2) eines wassergefüllten Blockschälchens getupft. Infolge des osmotischen Schocks platzten die Kerne, und das freigesetzte Chromatin wurde durch die Oberflächenspannung in der Luft-Wasser-Interphase als Film ausgespreitet. Mit Albumin beschichtete Kohlenetzchen wurden Proben des gespreiteten Materials abgenommen. Die Trägernetzchen wurden mit Filterpapier abgesaugt und nach der Ficoll-Technik (siehe unten) sofort weiterbehandelt.

10.3.2. Trocknung und Kontrastierung

10.3.2.1. Negativ-Färbung mit Uranyl-Acetat

Befilmte Trägernetze mit frisch adsorbiertem Chromatin wurden, nachdem die Filmoberflächen gewaschen und die überschüssige Flüssigkeit entfernt worden war, auf Tropfen einer 1 %igen wäßrigen Uranylacetat-Lösung (pH 4.2 - 4.4) gelegt. Nach 30 sec wurden die Grids abgenommen, mit Filterpapier drainiert und zum Trocknen in einer Petri-Schale auf Filterpapier gelagert.

10.3.2.2. Ficoll-Technik

Chromatinpräparationen auf albuminbeschichteten Kohleträgern wurden bei Raumtemperatur 6 min in 4 % Formaldehyd fixiert. Nach Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Grids 5 min mit einer 0.5 %igen wäßrigen Uranylacetat-Lösung gefärbt und abermals drainiert. Anschließend wurden sie nach SOLARI und MOSES (1976)

15 - 30 sec auf die Oberfläche einer Matrix-Lösung (1 % Ficoll und 1 % DMSO in Wasser) gelegt, mit Filterpapier drainiert und an der Luft getrocknet.

10.4. Allgemeines

Die elektronenoptischen Strukturuntersuchungen am Chromatin wurden mit einem Elmiskop 102 von Siemens bei 60 kV mit einer 30 µm-Objektivblende durchgeführt. Strukturüberlagernde Kontaminationen des Objekts durch Restgasmoleküle wurden durch indirekte Kühlung des Objektraums mit flüssigem Stickstoff weitgehend reduziert. Aufnahmen wurden mit Scientia Platten (Agfa Gevaert, 6.5 x 9 cm) bei Nominalvergrößerung von 40 000 und 60 000 gemacht. Die genaue Vergrößerung eines abgelichteten Feldes ließ sich nach Fokussierung des Objekts über den digitalangezeigten Objektivstrom aus einer Eichkurve ermitteln (FRANK und DAY, 1970). Photographische Vergrößerungen (2-, 3- und 5-fach linear, Liesegang, Rajah 5) wurden auf Record-Rapid-Papier (Agfa Gevaert) verschiedener Gradationen hergestellt.

11. Fixierung von Chromatin

Die Fixierung von Chromatin wurde hauptsächlich mit Glutaraldehyd durchgeführt. In einigen Fällen wurde mit Formaldehyd fixiert.

Die durch Polymerbildung stark verunreinigten Glutaraldehydlösungen (Merck GL 043) wurden durch dreimalige Absorption an Aktivkohle (Merck Nr. 2184) und anschließender Filtration gereinigt (GILETT und GULL, 1970). Die Anreicherung des Glutaraldehyds wurde aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima des Monomers (A_{max} = 280 nm) und des Polymers (A_{max} = 235 nm) spektralphotometrisch verfolgt. Als Fixierungsmittel wurden ausschließlich

Lösungen verwendet, deren A_{280}/A_{235}-Quotient $\leq$ 0.1 ($\hat{=}$ 60 - 80-fache Anreicherung des Monomers gegenüber dem Polymer) war. Die Konzentration der gereinigten Aldehyd-Lösung wurde aus seiner optischen Dichte bei 280 nm bestimmt: 1 o.d. $\hat{=}$ 2 % Glutaraldehyd (bei Raumtemperatur).

In gefrorenem Zustand war das Monomer mehrere Monate stabil.

Zur Herstellung reiner Formaldehyd-Lösungen wurde Paraformaldehyd mit dest. Wasser 2 h unter Rückflußkühlung gekocht. Die Konzentration (etwa 20 %ig) an gelöstem Formaldehyd ließ sich aus der eingesetzten Menge des Polymers berechnen. Formaldehyd-Lösungen wurden nicht länger als ein oder zwei Tage aufbewahrt.

Sowohl Glutaraldehyd als auch Formaldehyd wurden vor ihrer Verwendung entweder mit Natriumphosphat gepuffert oder mit Natronlauge neutralisiert.

Für eine optimale Fixierung wurden die Chromatinlösungen (0.1 - 0.5 mg DNS) mit 0.2 - 0.5 % Glutaraldehyd 2.5 - 3 h auf Eis oder mit 2 - 6 % Formaldehyd 6 - 15 min bei Raumtemperatur behandelt.

Um Nebenreaktionen auszuschließen, wurden die Fixierungen grundsätzlich nur in Gegenwart von Triäthanolamin- oder Phosphatpuffern, pH 6.8 - 7.2, durchgeführt. Zur Einstellung bestimmter Ionenstärken wurden je nach Bedarf die Chloride von Natrium, Magnesium und Calcium verwendet.

12. Elektrophoretische Analysen

12.1. DNS-Agarose-Gel-Elektrophorese

Chromatinlösungen ($A_{260} \geq$ 0.1 o.d.) wurden mit demselben Volumen 2 n NaCl, 0.5 M Tris, 0.05 M EDTA, 2 % SDS, pH 8.0 gemischt und nach

Zugabe von 500 µg Pronase P/ml (Serva, 1 h bei 60° C vorbehandelt) 2 - 4 h bei 37° C inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden einmal mit 2 Teilen Phenol (gesättigt in TE-Puffer: 0.01 M Tris, 0.001 M EDTA, pH 8.0) und einmal mit 2 Teilen Phenol/Chloroform (1 : 1) extrahiert. Anschließend wurden die wäßrigen Lösungen mit zwei Volumina abs. Äthanol versetzt und zur vollständigen Fällung der DNS über Nacht bei -20° C aufbewahrt. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden 10 min bei 10 000 x g sedimentiert, getrocknet und in wenig TE-Puffer aufgenommen. Pro Gel wurden 0.5 - 1 µg DNS (A_{260} = 0.01 - 0.02 o.d.) in einem Maximalvolumen von 50 µl aufgetragen.

Die DNS-Proben wurden nach SHARP, SUGDEN und SAMBROCK (1973) in 1 %- und 1.4 %-igen zylindrischen Agarosegelen (5 x 100 mm) elektrophoretisiert (3 mA/Gel). Nach der Elektrophorese wurden die Gele 2 - 3 h mit einer wäßrigen Ethidiumbromid-Lösung (0.5 µg/ml) gefärbt. Die DNS-Banden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera photographiert. Die Molekulargewichte der DNS-Fragmente wurden durch Kalibration des Gelsystems mit definierten fd RF DNS-Fragmenten bestimmt, die durch Schneiden der Phagen-DNS mit dem Restriktionsenzym Hpa II erhalten wurden (SEEBURG und SCHALLER, 1975).

12.2. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach LAEMMLI (1970)

Fixierte oder unfixierte Chromatinproben wurden extensiv gegen bidest. Wasser dialysiert und falls nötig (DNS-Konzentration < 150 µg/ml) lyophilisiert. Vor der Elektrophorese wurden die Lösungen im Verhältnis 2 : 1 mit SDS-Mix (Gemisch aus 10 Teilen (Tln.) 20 % SDS, 10 Tln. 87 % Glyzerin, 5 Tln. Mercaptoäthanol,

1 Tl. 0.1 % Bromphenolblau und 6.25 Tln. 1 M Tris, pH 6.8) versetzt und 1.5 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Aufgetragen werden 3 - 8 µg Protein in Volumina, die nicht größer als 50 µl waren.

Die Proteine wurden nach LAEMMLI über Plattengele (1.5 mm dick, 111 mm breit) aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentrationen für das Sammel- (30 - 40 mm hoch) und Trenngel (100 mm hoch) waren 5 bzw. 12.5 %-ig. Die Elektrophorese wurde mit 12 mA begonnen. Nach Penetration der Farbfront in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 16 mA erhöht.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei annähernd physiologischen Salzkonzentrationen (40 - 150 mM NaCl) sind die chromosomalen Fasern aus kompakten, globulären Strukturen aufgebaut, die einen Durchmesser zwischen 180 und 210 Å haben.

Die globulären Strukturen der kondensierten Fasern können durch kontrollierte Fragmentierung mit Nuklease angereichert werden. Sie enthalten 6 - 10 Nukleosomen und haben Sedimentationskonstanten von etwa 40 - 50 S.

Die globulären Strukturen werden durch kooperativ gebundene Histon H1-Moleküle zusammengehalten. Zur Ausbildung einer kooperativen Interaktion zwischen H1 und der Chromatinfaser werden mono- oder divalente Ionen benötigt. Werden die Ionen entfernt, verlieren die H1-Moleküle ihre Fähigkeit als Packungsproteine zu agieren. Die Folge ist, daß die chromosomalen Fasern (200 Å) zu extendierten Nukleosomenketten (85 Å) entfaltet werden, an die die H1-Moleküle gleichmäßig verteilt gebunden sind (nichtkooperative Bindung). Die Entfaltung der Fasern als Konsequenz des Übergangs von kooperativer zu nichtkooperativer Bindung des H1 erfolgt in einem engen Salzbereich zwischen 35 und 10 mM NaCl.

Histon H1-freie Fasern liegen in Lösungen niedriger ($\leq$ 10 mM) und mittlerer (40 - 100) NaCl-Konzentrationen als Nukleosomenketten (85 Å) vor, nehmen aber nach Rekombination mit H1 wieder $\sim$ 200 Å-dicke, globuläre Strukturen ein. Das Histon H1 spielt demnach eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Struktur der Chromatinfasern. Wahrscheinlich reflektiert die 200 Å-dicke, globuläre Faser die Struktur der inaktiven chromosomalen Faser in vivo.

LITERATURVERZEICHNIS

ADLER, A.J. und FASMAN, G.D. (1971) J.Phys.Chem. 75, 1516

ANDERSON, T.F. (1956) In: Phys.Techn. in Biol.Res. III
(G. OSTERN und A.W. POLLISTER, eds.)
New York

AXEL, R. (1975) Biochemistry 14, 2921

BALDWIN, J.P., BOSELEY, P.G., BRADBURY, E.M. und IBEL, K. (1975)
Nature 253, 245

BLOBEL, G. und POTTER, R.V. (1966) Science 154, 1662

BONNER, J., CHALKLEY, G.R., DAHMUS, M., FAMBROUGH, D., FUJIMURA, F.,
HUANG, R.C.C., HUBERMAN, J., MARUSHIGE, K., OHLENBUSCH, H.,
OLIVERY, B. und WIDHOLM, J. (1967)
Methods in Enzymology, Vol. 12, S. 13, Academic Press,
New York

BONNER, W.M. und POLLARD, H.B. (1975) Biochem.Biophys.Res.Commun.
64, 282

BRADBURY, E.M., DANBY, S.E., RATTLE, H.W.E. und GIANCOTTI, V. (1975)
Eur.J.Biochem. 57, 97

BRADBURY, E.M. (1975) Ciba Foundation Symp. 28, 1

BRAM, S. und RIS, H. (1971) J.Mol.Biol. 55, 325

BRASCH, K. (1976) Exp.Cell Res. 101, 396

BUSCH, H. (1967) Methods in Enzymology, Vol. 12, S. 421
Academic Press, New York

CHAMBERLAIN, P.J. und WALKER, P.M.B. (1965) J.Mol.Biol. 11, 1

CHAMBERLIN, M.E., BRITTEN, E.J. und DAVIDSON, E.H. (1975)
J.Mol.Biol. 96, 317

CLARK, R. und FELSENFELD, G. (1971) Nature 229, 101

CRICK, F.C.H. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci. 73, 2639

DAVIDSON, E.H., HOUGH, B.R., AMENSON, C.S. und BRITTEN, R.J. (1973) J.Mol.Biol. 77, 1

DAVIES, H.J. (1968) J.Cell Sci. 3, 129

DAVIES, H.G. und SMALL, J.V. (1968) Nature 217, 1122

DAVIES, H.G., MURRAY, A.B. und WAMSLEY, M.E. (1974) J.Cell Sci. 16, 261

DAVIES, H.G. und HAYNES, M.E. (1976) J.Cell Sci. 21, 315

DeLANGE, R.G. und SMITH, E.L. (1975) Ciba Foundation Symp. 28, 59

De NOOIJ, E.H. und WESTENBRINK, H.G.K. (1962) Biochim.Biophys. Acta 62, 608

DOENEKE, H.G. und McCARTHY, B.J. (1976) Eur.J.Biochem. 64, 405

DuPRAW, E.J. (1965) Nature 206, 338

DuPRAW, E.J. (1965b) Nature 206, 338

DuPRAW, E.J. (1966) Nature 209, 577

DuPRAW, E.J. (1970) DNA and Chromosomes (N.Y.: HOLT, RINEHART und WINSTON)

EVENSON, D.P., MEGO, W.A. und TAYLOR, J.H. (1972) Chromosoma 39, 225

EVERID, A.C. und SMALL, H.G. (1970) J.Cell Sci. 7, 35

FINCH, J.T., NOLL, M. und KORNBERG, R.D. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci., USA 69, 2300

FINCH, J.T. und KLUG, A. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 73, 1897

FRANK, H. und DAY, L.A. (1970) Virology 42, 144

FRANKE, W.W., SCHEER, U., TRENDELENBURG, M.F., SPRING, H. und ZENTGRAF, H. (1977) Vordruck zur Veröffentlichung

GALL, J.G. (1963) Science 139, 120

GALL, J.G. (1966) Chromosoma 20, 221

GILETT, R. und GULL, K. (1972) Histochem. 30, 162

GOLOMB, H.M. und BAHR, G.F. (1974) Chromosoma 46, 233

GOOD, N.E., WINGET, G.D., WINTER, W., CONOLLY, T.N., IZAWA, S., und SINGH, R.M. (1966) Biochemistry 5, 467

GRIFFITH, J.D. (1975) Science 187, 1202

HAMKALO, B.A., MILLER, O.L. und BAKKEN, A.H. (1973) CSH Symp.Quant.Biol. 38, 915

HAUSEN, P., STEIN, H. und PETERS, H. (1969) Europ.J.Biochem. 9, 542

HEWISH, D.R. und BURGOYNE, L.A. (1973) Biochem.Biophys.Res. Commun. 52, 504

HOZIER, H., RENZ, M. und NEHLS, P. (1977) Chromosoma (zur Veröffentlichung angenommen)

ILYIN, Y.V., VARSHAWSKY, A.Y., MICKELSAAR, U.N. und GEORGIEV, G.P. (1971) Eur.J.Biochem. 22, 235

JOHNS, E.W. (1971) Histones and Nukleohistones (D.M.P. PHILIPPS, ed.) 2, Plenum, New York

KAUFMAN, B.P., GAY, H. und McDONALD, M.R. (1960) Rev.Cytology 9, 77

KAYE, J.S. und McMASTER-KAYE, H. (1966) J.Cell Biol. 31, 159

KAYE, J.S. (1969) Handbook of Molecular Cytology
(A. LIMA-de-FARIA, ed.) 361-380
North-Holland Publ., Amsterdam

KELLENBERGER, E. (1963) The Interpretation of Ultrastructure
(R.J.C. HARRIS, ed.) 233-249
Academic Press, New York

KIRYANOV, G.I., MANAMSHJAN, T.A., POLYAKOV, V.Yu., FAIS, D. und CHENTSOV, Ju.S. (1976) Febs Letters 67, 323

KOEHLER, J.K. (1970) J.Ultrastruct.Res. 33, 598

KOEHLER, J.K. (1972) J.Ultrastruct.Res. 39, 520

KORNBERG, R.D. (1974) Science 184, 868

KORNBERG, R.D. und THOMAS, J.O. (1974) Science 184, 865

LAEMMLI, U.K. (1970) Nature 227, 680

LAMPERT, F. (1971) Nature, N.B., 234, 187

LANG, D. (1973) J.Mol.Biol. 78, 247

LeSTOURGEON, W.M., FORER, A., YANG, Y.-Z., BERTRAM, J.S. und RUSCH, H.P. (1975) Biochim.Biophys.Acta 379, 529

LEWIS, E.A., DeBUYSERE, M.S. und REES, A.W. (1976) Biochemistry 15, 186

McLEAN, J.D. und SINGER, S.J. (1971) J.Mol.Biol. 56, 633

MELLEMA, J.E. und VAN BRUGGEN, E.F. (1968) J.Mol.Biol. 71, 75

MILLER, O.L. und BEATTY, B.R. (1969) Science 164, 955

MILLER, O.L., HAMKALO, B.A. und THOMAS, C.A. (1970) Science 169, 392

MOSES, M.J. und SOLARI, A.J. (1976) J.Ultrastruct.Res. 54, 109

NICOLINI, C., BESERGA, R. und KENDAL, F. (1976) Science 192, 796

NOLL, M. (1974) Nature 251, 249

NOLL, M., THOMAS, J.O. und KORNBERG, R.D. (1975) Science 187, 1203

OHLENBUSCH, H.H., OLIVERA, B.M., TUAN, D. und DAVIDSON, N. (1967) J.Mol.Biol. 25, 299

OLINS, A.L. und OLINS, D.E. (1974) Science 183, 330

OLINS, A.L. (1975) J.Cell Biol. 64, 528

OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. und CHAMBON, P. (1975) Cell 4, 281

PARDON, J.F. und WILKINS, M.H. (1972) J.Mol.Biol. 68, 115

PAUL, J. und GILMOUR, R.S. (1966) J.Mol.Biol. 16, 242

POOLEY, A.S., PARDON, J.F. und RICHARDS, B.M. (1974) J.Mol.Biol. 85, 533

RABINOWITZ, Y. (1964) Blood 23, 811

RALL, S.C. und COLE, R.D. (1971) J.Biol.Chem. 246, 7175

REES, A.W., DeBUYSERE, M.S. und LEWIS, E.A. (1974) Biochem.Biophys. Acta 361, 97

RENZ, M. und DAY, L.A. (1976) Biochemistry 15, 3220

RIS, H. (1961) Can.J.Genet.Cytol. 3, 95

RIS, H. und CHANDLER, B. (1963) CSH Symp.Quant.Biol. 28, 1

RIS, H. (1966) Proc.Roy.Soc. (London) 164, 246

RIS, H. (1967) Regulation of nucleic acid protein biosynthesis (KONINGSBERGER und BOSCH, eds.) S. 10 Elsevier Publ. Co., Amsterdam

RIS, H. (1969) Handbook of Cytology (A. LIMA-de-FARIA, ed.) 221 North-Holland Publ., Amsterdam

RIS, H. und KUBAI, D.F. (1970) Annu.Rev.Genet. 4, 263

RIS, H. (1975) Ciba Foundation Symposium on the Structure and Function of Chromatin (D.W. FITZSIMMONS und G.E.W. WOLSTENHOLME, eds.) 7-28, North-Holland Publ., Amsterdam

SANTIERE, P., WOUTERS-TYRON, D., LAINE, B. und BISERTE, G. (1975) Ciba Foundation Symp. 28, 77

SEEBURG, H.P. und SCHALLER, H. (1975) J.Mol.Biol. 92, 261

SHARP, P.A., SUGDEN, B. und SAMBROCK, J. (1975) Biochemistry 12, 3055

SHAW, B.R., HERMAN, T.M., KOVACIC, R.T., BEAUDREAU, G.S. und VAN HOLDE, K.E. (1976) Proc.Natl.Acad.Sci., USA 73, 505

SOLARI, A.J. (1971) Exp.Cell Res. 67, 161

SOLARI, A.J. (1972) Chromosoma 39, 237

SOLARI, A.J. (1974) The Cell Nucleus, Vol. I (H. BUSCH, ed.) Academic Press, New York und London

SOLLNER-WEBB, B. und FELSENFELD, G. (1975) Biochemistry 14, 2915

SPONAR, J. und SORMOVA, Z. (1972) Eur.J.Biochem. 29, 99

STUBBLEFIELD, E. (1973) Int.Rev.Cytology 35, 1

TENG, C.S., TENG, C.T. und ALLFREY, V.G. (1971) J.Biol.Chem. 246, 3597

THOMAS, J.O. und KORNBERG, R.D. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci., USA 72, 2626

TOUVET-POLIAKOW, M.-C., DUANE, M.P. und CHAMPAGNE, M.H. (1970) Eur.J.Biochem. 16, 414

VanLENTE, F., JACKSON, J.F. und WEINTRAUB, H. (1975) Cell 5, 45

VARSHAWSKY, A.J., BAKAJEV, V.K. und GEORGIEV, G.P. (1976) Nucl.Acid Res. 3, 477

WEINTRAUB, H., WORCEL, A. und ALBERTS, B. (1976) Cell 9, 409

WOLFE, S.L. (1965) J.Ultrastruct.Res. 12, 104

WOLFE, S.L. und HEWITT, G.M. (1966) J.Cell Biol. 31, 31

WOLFE, S.L. und GRIM, J.N. (1967) J.Ultrastruct.Res. 19, 382

WOODCOCK, C.L.F. (1973) J.Cell Biol. 59, 368a

ZENTGRAF, H., FALK, H. und FRANKE, W.W. (1975) Cytobiology 11, 10

ZIRKIN, B. und WOLFE, S.L. (1972) J.Ultrastruct.Res. 39, 496

ZUBAY, G. und DOTY, P. (1959) J.Mol.Biol. 1, 1

ZUBAY, G. und WILKINS, M.H.F. (1962) J.Mol.Biol. 4, 444

DANKSAGUNG

Herrn Priv.-Doz. Dr. C. PELLING danke ich für die vielseitige und wohlwollende Unterstützung dieser Arbeit, sowie für das sorgfältige und kritische Lesen des Manuskripts.

Herrn Dr. F. BONHOEFFER, in dessen Abteilung ich arbeiten durfte, danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, und für die wertvollen Ratschläge und Diskussionen.

Herrn Professor Dr. A. GIERER möchte ich für das große Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte, sowie für zahlreiche anregende und kritische Diskussionen danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. RENZ und Herrn Dr. J. HOZIER für die gute Zusammenarbeit in einer freundschaftlichen Atmosphäre. Ihr Sachverstand und ihre Hilfsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Frau Chr. HORMOZDIARY, Herrn G. BERGER und den Damen von der Photoabteilung danke ich herzlich für die Fertigstellung des Manuskripts und der Abbildungen.

LEBENSLAUF

Familienname, Vorname:	NEHLS, Peter
Geburtstag, Geburtsort:	16.3.1944, Heidenheim/Brz.
Eltern:	Werner NEHLS und Ehefrau Ilse, geb. FÄHNLE
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Anschrift:	7400 Tübingen, Eduard-Spranger-Straße 32
Schulausbildung:	
1950 - 1954	Grundschule in Heidenheim
1954 - 1964	Humanistisches Gymnasium in Heidenheim
Studium:	
WS 64/65 - SS 70	Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Universität Tübingen
WS 70/71 - SS 71	Studium der Chemie und Biochemie an der Universität München
WS 71/72 - WS 72/73	Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Universität Tübingen
1972	Diplomprüfung in Physiologischer Chemie und Biochemie
1972 - 1973	Diplomarbeit am Toxikologischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. REMMER
1973 - 1977	Dissertation unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. C. PELLING und Herrn Dr. F. BONHOEFFER am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung für Physikalische Biologie, Tübingen
Familienstand:	
19.3.1965	Eheschließung mit Ingrid STELZENMÜLLER aus Heidenheim/Brz.; zwei Kinder

Meine akademischen Lehrer waren:

E. BAYER	K. KÜHN	W. RÜDORFF
Th. BÜCHER	F. LYNEN	F. SCHNEIDER
E. BÜNNING	H. MAUSER	W. SEYFFERT
A. GIERER	F. MÖHRES	G. WEITZEL
H.P. HOFSCHNEIDER	E. MÜLLER	H.G. ZACHAU
G. KORTÜM	C. PELLING	H. ZÄHNER
H. KRÜGER	H. REMMER	